



Sanna Niekkamaa

GLIOOMIEN MOLEKYYLIPATOLOGINEN LUOKITTELU

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Helmikuu 2020

TIIVISTELMÄ

Sanna Niekkamaa: Glioomien molekyylipatologinen luokittelu
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteen lisensiaatin tutkinto-ohjelma
Helmikuu 2020

Aivokasvaimet luokitellaan WHO:n luokituksen mukaisesti (The World Health Organization of Tumors of the Central Nervous System). Ensimmäinen luokitteluohje on ilmestynyt vuonna 1952 ja tämän hetkinen uusin vuonna 2016. Uusin luokittelu eroaa merkittävimmin edellisestä vuoden 2007 luokittelusta siten, että uudessa luokittelussa genetiikka on vakiinnutettu tärkeäksi osaksi diagnostiikkaa, kun aiemmin luokittelu on perustunut pääasiassa kasvainten histologiaan.

Tutkimuksen tavoitteena oli luokitella Tampereen yliopistollisessa sairaalassa vuosina 2006-2016 leikatut diffuusit glioomat, eli astrozytoomat ja oligodendroglioomat, uudelleen käyttäen WHO 2016 luokittelun kriteereitä ja vertailla, antaako uusi luokitus tarkemman prognostisen arvon verrattuna vuoden 2007 luokitteluun. Diffuusit glioomat luokiteltiin lisäksi TCGA-kriteerien (The Cancer Genome Atlas) mukaisesti luokkakajakoihin. TCGA-luokitus perustuu pelkästään IDH-mutaatiotietoon ja 1p/19q-kodeleetiostatukseen, eli kasvainten molekyylogeneettisiin parametreihin, sekä nekroosin ja/tai mikrovaskulaarisen proliferaation esiintymiseen tuumorissa. Tarkoituksena oli pohtia, miten diffuusit glioomat kannattaisi tulevaisuudessa luokitella ja voisiko luokittelu perustua pelkästään molekylaarisiin tekijöihin eli ovatko histologiset gradukset edelleen tärkeitä diagnostiikassa. Lisäksi haluttiin arvioida yksittäisten molekyylogeneettisten parametrien vaikutuksia elinajanodotteisiin ja sitä, miten MIB-1-proliferaatioindeksi vaihtelee kasvaintyyppien välillä ja onko sillä merkitystä diagnostiikassa. Tutkimuksen potilasaineisto käsitti yhteensä 376 leikattua glioomapotilasta. Leikatuista tuumoreista primaarisia oli 269. Tuumoreista oli suoritettu erilaisia jo kliinis-patologisessa käytössä olevia molekyylipatologisia ja -geneettisiä analyyseja. Aineistot analysoitiin tilastollisesti IBM Statistics 22-ohjelmalla (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Analyyseihin käytettiin Chi-neliö-, Kaplan-Meier-, log-rank- ja Kruskal-Wallis-testejä sekä Coxin monimuuttujamallia.

Tässä tutkimuksessa TCGA-luokitus osoittautui parhaaksi itsenäiseksi ennustetekijäksi, eli tämän perusteella voidaan olettaa, että molekyylogeneettiset parametrit ovat tärkeässä roolissa diffuusien glioomien diagnostiikassa. Sen sijaan histologinen gradus ei eloonjäämiskuvaajien mukaan olisi yhtä merkittävä tekijä ennustearvioinnissa. Tällä hetkellä gradus vaikuttaa esimerkiksi hoitolinjan valintaan, mutta pohdittavaksi jää, mikä on sen merkitys tulevaisuudessa diffuusien glioomien luokittelussa. Mahdollisesti yksi toimintatapa olisi, että aluksi patologi määrittää, että kyseessä on histologisesti diffuusi gliooma ja onko näkyvissä nekroosia tai atyyppista mikrovaskulaarista proliferaatiota. Tämän jälkeen kasvaimet voitaisiin luokitella TCGA-kriteerien mukaisesti luokkakajakoihin.

Avainsanat: astrozytooma, oligodendrogliooma, WHO-luokitus, IDH1, 1p/19q, diagnostiikka, prognoosi

SISÄLLYS

| | |
|---|----|
| 1 JOHDANTO | 5 |
| 1.1 Yleistä glioomista ja niiden luokittelusta | 5 |
| 1.2 Diffuusit gliomat (WHO 2016) | 7 |
| 1.2.1 Diffuusi astrozytoma, gradus II (<i>IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS</i>) | 7 |
| 1.2.2 Anaplastinen astrozytoma, gradus III (<i>IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS</i>) | 7 |
| 1.2.3 Glioblastoma, gradus IV (<i>IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS</i>) | 8 |
| 1.2.4 Oligodendroglioma, gradus II (<i>IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleetio, NOS</i>) | 9 |
| 1.2.5 Anaplastinen oligodendroglioma, gradus III (<i>IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleetio, NOS</i>) | 10 |
| 1.2.6 Sekamuotoinen oligoastrozytoma, gradus II (<i>NOS</i>) & sekamuotoinen anaplastinen oligoastrozytoma, gradus III (<i>NOS</i>) | 11 |
| 1.3 Diffuusien gliomien molekyylipatologiaa | 12 |
| 1.3.1 Immunohistokemialliset tekijät | 12 |
| 1.3.1.1 IDH 1 | 12 |
| 1.3.1.2 ATRX | 13 |
| 1.3.1.3 p53 | 13 |
| 1.3.1.4 EGFR | 14 |
| 1.3.1.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi | 14 |
| 1.3.2 Kromosomaaliset ennustetekijät | 15 |
| 1.3.2.1 1p/19q-deleetiot | 15 |
| 1.4 Diffuusien gliomien hoito | 15 |
| 1.5 Tutkimuksen tavoitteet | 16 |
| 2 AINEISTO JA MENETELMÄT | 16 |
| 2.1 Kasvainluokitukset | 16 |
| 2.1.1 WHO 2016-kasvainluokituksen mukainen jaottelu | 16 |
| 2.1.2 TCGA-ryhmän mukainen luokittelu | 17 |
| 2.2 Potilasaineisto | 18 |
| 2.3 Immunohistokemialliset menetelmät | 19 |
| 2.3.1 IDH 1 | 19 |
| 2.3.2 ATRX | 20 |
| 2.3.3 p53 | 20 |
| 2.3.4 EGFR CISH | 21 |
| 2.3.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi | 21 |
| 2.4 Kromosomaaliset ennustetekijät | 22 |
| 2.4.1 1p/19q-kodeleetio | 22 |
| 2.5 Tilastolliset menetelmät | 22 |
| 3 TULOKSET | 22 |
| 3.1 Kliinispatologisten muuttujien keskinäiset suhteet | 22 |
| 3.2 Kasvainten jakautuminen WHO 2007- ja WHO 2016-luokitteluissa | 26 |
| 3.3 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi | 29 |
| 3.4 Eloönjäämisanalyysit | 33 |
| 3.4.1 IDH 1 | 33 |
| 3.4.2 ATRX | 35 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 3.4.3 p53 | 36 |
| 3.4.4 EGFR | 37 |
| 3.4.5 WHO-luokitukset | 39 |
| 3.4.6 TCGA-ryhmän luokitus | 42 |
| 3.5 Cox-monimuuttujamalli | 43 |
| 4 POHDINTA | 45 |
| 4.1 IDH 1 | 45 |
| 4.2 ATRX | 45 |
| 4.3 p53 | 46 |
| 4.4 EGFR | 46 |
| 4.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi | 46 |
| 4.6 Menetelmien ennustearvo | 47 |
| 4.7 Lopuksi | 48 |
| 5 LÄHTEET | 49 |

JOHDANTO

1.1 Yleistä glioomista ja niiden luokittelusta

Gliomat ovat tavallisimpia aikuisten keskushermostokasvaimia (taulukko 1). Ne saavat alkunsa aivokudoksen tuki- eli gliasoluista, joita ovat astrosyytit, oligodendrosyytit ja endependymisolut, tai niiden kantasoluista. Uusia glioomatapauksia ilmenee vuosittain 6/100 000 henkilöä ja ne sijaitsevat useimmiten aivojen otsa- ja ohimolohkoissa. Kasvaimet jaetaan histologisen erilaistumisasteensa mukaisesti graduksiin I-IV. Gradusten II-IV gliomat kasvavat diffuusisti infiltroiden ja ne luokitellaan histologian ja geneettisten tekijöiden perusteella astrosytoomiin ja oligodendroglioomiin. Luokitukseen on jätetty myös sekamuotoisen oligoastrooman diagnoosi. (1)

Aivokasvainten diagnostiikka perustuu WHO:n luokitteluun (The World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System). Ensimmäinen luokitteluopas, eli WHO:n ”sininen kirja”, ilmestyi vuonna 1952 ja tämän hetkinen uusi luokitus vuonna 2016. (2)

Aivokasvaimet on luokiteltu histologisesti jo melkein vuosisadan ajan perustuen valomikroskooppisiin löydöksiin hematosykliini-eosiini-värjäyksessä. Myöhemmin mukaan diagnostiikkaan on tullut arviointi elektronimikroskoopilla ja proteiinien immunohistokemialliset ilmentymät. Vuosien 2000 ja 2007 WHO-luokitukset käyttivät myös geneettisiä tekijöitä arvioinnin taustalla, mutta silloin genetiikasta saatiin vain lisäinformaatiota diagnoosia varmennettaessa. Sen sijaan vuoden 2016 WHO-luokituksessa geneettisillä tekijöillä on tärkeä rooli. Geneettiset tekijät saadaan analysoidua immunohistokemiallisilla- ja molekyylogeneettisillä menetelmillä, mutta koska aina se ei ole mahdollista, on uuteen luokitukseen kuitenkin jätetty NOS-luokka (not otherwise specified). Tähän siis kuuluvat kasvaimet, joita ei ole jostakin syystä saatu molekyyliytipitettyä tai joista ei ole löydetty diagnostisia geneettisiä muutoksia. (3)

Uuden fenotyypin ja genotyypin yhdistävän luokituksen toivotaan lisäävän aivokasvaindiagnostiikan objektiivisuutta ja johtavan biologisesti homogeenisempään ja tiukemmin luokiteltuun kokonaisuuteen. Näin ollen on oletettavaa, että diagnostiikan ollessa tarkempaa, myös potilaiden ennusteen määrittäminen ja oletettu hoitovaste ovat parempia. Uudesta luokituksesta löytyy myös edelleen aiemmin paljon käytetty diffuusien gliomien alaluokkaan kuuluva oligoastrocytoma-kategoria, jonka kasvaimet ovat aina olleet vaikeasti luokiteltavissa. Oligoastrocytoma on kasvaimena diffuusi glioma, joka koostuu morfologisesti kahden solutyypin

yhdistelmästä, eli muistuttaa sekä oligodendrogliaalista että astrozytääristä kasvainta. Kun käytetään genotyyppiluokitusta, eli esim. IDH-mutaatietietoa ja 1p/19q-kodeleetiostatusta, suurin osa oligoastrozytoomista saadaan luokiteltua joko astrozytoomiksi tai oligodendroglioomiksi, jolloin jäljelle jää vain erittäin pieni osa oikeasti oligoastrozytoomaksi luokiteltavia kasvaimia. (3)

Uudessa luokituksessa on myös omat haasteensa. Mikäli kasvain histologisesti vaikuttaisi esimerkiksi astrozytoomalta, mutta genotyyppityksessä selviää, että siinä on IDH-mutaatio ja 1p/19q-kodeleetio, on päätetty, että genotyyppi menee fenotyypin edelle, eli tällaisessa tapauksessa olisi kyse oligodendroglioomasta. Toisaalta tämän vuoksi nousee esiin myös kysymys, olisiko luokittelu mahdollista perustaa pelkästään genetiikkaan ilman histologiaa. Tällä hetkellä se ei kuitenkaan ole mahdollista, vaan aluksi on tehtävä fenotyypin perusteella histologinen diagnoosi diffuusi gliooma, jotta ymmärretään spesifien geneettisten muutosten kliininen merkitys. Fenotyyppitys on tärkeää myös siksi, että niin kuin aiemmin mainittiin, on yksittäisiä kasvaimia, joita ei saa sovitettua tiukkoihin genotyyppikriteereihin. On mahdollista, että tulevaisuudessa histologian merkitys gliomien luokittelussa vähenee entisestään. Tämän hetkinen vuoden 2016 WHO:n luokitus kuitenkin perustuu integroituihin diagnooseihin, joissa feno- ja genotyyppi yhdistetään. Genetiikan lisääminen diagnostiikkaan on kuitenkin ongelmallista myös siksi, että genotyyppaus ei ole aina mahdollista, sillä kaikkialla ei ole siihen tarvittavia laitteita ja välineitä. Toisaalta immunohistokemiallisten menetelmien saatavuus paranee kokoajan, joten tämä ongelma todennäköisesti poistuu tulevaisuudessa. (3)

| | Gradus |
|---|----------------|
| Diffuusit astrozytoomat ja oligodendroglioomat | II, III, IV |
| Muut astrozytoomat | I, II, III |
| Ependymoomat | I, II, III |
| Muut glioomat | I, II |
| Suonipunoksen tuumorit | I, II, III |
| Neuronaaliset ja sekamuotoiset neuronaalis-gliaaliset tuumorit | I, II, III |
| Käpylisäkkeen tuumorit | I, II, III, IV |
| Embryonaaliset tuumorit | IV |
| Aivo- ja paraspinaalihermojen tuumorit | I, II, III, IV |
| Meningeoomat | I, II, III |
| Muut mesenkymaaliset tuumorit | I, II, III, IV |
| Melanosyyttiset tuumorit | |
| Lymfoomat | |
| Histosyyttiset tuumorit | |
| Itusolutuumorit | |
| Sellan seudun tuumorit | |
| Metastaasit | |

Taulukko 1. Keskushermostokasvainten luokittelu (WHO 2016)

1.2 Diffuusit glioomat (WHO 2016)

1.2.1 Diffuusi astrozytooma, gradus II (IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS)

Diffuusisti infiltroivat graduksen II astrozytoomat jaotellaan histologisesti WHO:n kriteerien mukaan IDH-mutanttiin ja IDH-villityypin diffuusiin astrozytoomaan. IDH-mutantista diffuusista graduksen II-kasvaimesta löytyy joko IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatio. Diagnoosia tukevat ATRX- ja p53-mutaatiot, mutta niitä ei välttämättä esiinny. Astrozyttäriset kasvaimet erotetaan oligodendrogliomasta siten, että astrozytoomissa ei ole 1p/19q-kodeleetiota. Graduksen II IDH-mutantteja astrozytoomia on noin 11-15 % prosenttia astrozyttärisistä kasvaimista ja niille on tyypillistä korkea-asteinen solujen erilaistuminen ja hidas kasvu. Diffuusilla astrozytoomalla on taipumus maligniin progressioon, jolloin se kehittyy anaplastiseksi graduksen III astrozytoomaksi ja edelleen glioblastoomaksi. (4)

Diffuusi astrozytooma on yleisin nuorilla aikuisilla ja siihen sairastumisen keski-ikä onkin noin 35 vuotta. Se sijaitsee useimmiten frontaalilohkossa ja on yleisempi miehillä kuin naisilla. Kasvain oireilee tyypillisesti epileptisinä kohtauksina, puheentulonvaikeuksina, tunto- ja näkömuutoksina sekä motorisina ongelmina. Etuaivolohkossa sijaitessaan se voi aiheuttaa myös persoonallisuuden muutoksia. (4)

Graduksen II IDH-villityypin astrozytoomasta ei löydetä IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatiota ja sillä on huonompi ennuste kuin IDH-mutantilla. IDH-villityypin astrozytoomat ovat harvinaisia ja usein ne voidaan luokitella uudelleen muiden geneettisten analyysien perusteella. (4)

Graduksen II diffuusi astrozytooma saa NOS-diagnoosin, mikäli IDH-statusta ei ole saatu määritettyä (4).

1.2.2 Anaplastinen astrozytooma, gradus III (IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS)

Graduksen III IDH-mutantista astrozytoomasta löydetään IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatio, kuten graduksen II IDH-mutantista astrozytoomasta, ja siinäkin esiintyy monesti ATRX- ja p53-mutaatiot. Se voi kehittyä diffuusista gradus II gliomasta, mutta useimmiten ilmenee suoraan gradus III:n kasvaimena. Se voi myös edetä glioblastoomaksi. Graduksen III astrozytoomassa on suurempi mitotoittinen aktiivisuus kuin graduksen II astrozytoomassa ja usein havaittavissa on voimakasta

tuma-atypiaa ja solukkuuden lisääntymistä. Kasvaimen ilmaantumisen keski-ikä on 38 vuotta ja se sijaitsee yleisimmin isoaivoissa. Oireet ovat samankaltaiset, kuin graduksen II astrozytomaissa. (5)

Graduksen III IDH-villityypin astrozytoma on epätavallinen ja niitä on noin 20 % anaplastisista astrozytomaista. Vastaavalla tavalla kuin graduksen II kasvaimissa, myös graduksen III IDH-villityyppi on aggressiivisempi ja sillä on huonompi ennuste kuin IDH-mutantilla kasvaimella. (5)

NOS-diagnoosi on käytössä myös anaplastisen astrozytoman kohdalla, mikäli IDH-statusta ei ole saatu määritettyä. (5)

1.2.3 Glioblastoma, gradus IV (IDH-mutantti, IDH-villityyppi, NOS)

Glioblastoma, eli gradus IV astrozytoma, on aikuisten yleisin maligni aivotuumori ja niitä onkin 15 % intrakraniaalisista kasvaimista ja 45-50 % kaikista primaareista maligneista aivokasvaimista. Euroopassa, Pohjois-Amerikassa ja Australiassa ilmaantuvuus on noin 3-4 tapausta/100 000 henkilöä. (6)

Glioblastomalla on hoidettunakin huono ennuste ja keskimääräinen elinikä on vain noin 15-18 kk diagnoosista. Alle 5 % on elossa viiden vuoden kuluttua ja ennuste on sitä huonompi, mitä vanhempi potilas on kyseessä. Ennustetta parantaa hieman, mikäli kasvaimesta löydetään MGMT-promoottorimetylaatio tai IDH-mutaatio. (6)

Glioblastomalle on tyypillistä diffuusin kasvutavan lisäksi se, että se on huonosti erilaistunut ja mitotoitisesti aktiivinen. Glioblastoimissa on havaittavissa myös tuma-atypiaa, solujen monimuotoisuutta sekä mikrovaskulaarista proliferaatiota ja mahdollisesti nekroosia.

Glioblastoimissa proliferaatioindeksi Ki-67 on yleensä korkea, keskimäärin noin 15-20 %, mutta se voi olla jopa yli 50 %. Kasvain leviää infiltraatiivisesti kuten kaikki diffuusit glioomat, mutta lisäksi sille on ominaista nopea invaasio viereisiin aivojen osiin.

IDH-villityypin glioblastoma on glioblastoimista yleisin kattaen niistä 90 %. Siihen sairastuneet ovat tyypillisesti 55-85-vuotiaita. IDH-villityypin glioblastoimia on enemmän miehillä kuin naisilla, ja ne ovat harvinaisia alle 40-vuotiailla. Ne ovat usein primaarisia glioblastoimia, eli eivät ole kehittyneet alemmista muodoista. IDH-villityypin glioblastoma sijaitsee useimmiten supratentoriaalisesti ja leviää nopeasti ympäröiviin aivojen osiin ja corpus callosumin kautta toiselle aivopuoliskolle. Temporaalilohkossa sijaitsee 31 %, parietaalilohkossa 24 %, frontaalilohkossa 23

% ja okkipitaalilohkossa 16 % IDH-villityypin glioblastoomista. EGFR-monistuma löydetään 40 % IDH-villityypin glioblastoomista. Oireet kehittyvät nopeasti ja riippuvat tuumorin sijainnista. Yleensä niihin kuuluu hemipareesi ja afasia sekä ödeema ja noussut aivopaine, jonka seurauksena päänsärky, pahoinvointi ja oksentelu. Potilaista puolella tuumori oireilee epilepsiakohtauksena. Muita oireita ovat käytöksen muuttuminen ja neurokognitiivisen muutokset. (6)

IDH-mutantista glioblastoomasta löydetään IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatio. Niitä on glioblastoomista vain 10 %. IDH-mutantit glioblastoomat ovat yleensä sekundaarisia eli kehittyvät alemman graduksen astrozytomaista. Keski-ikä sairastumiselle on 45 vuotta, eli alhaisempi kuin IDH-villityypin glioblastoomilla, ja sairastuneista naisia on suunnilleen yhtä paljon kuin miehiä. Toisin kuin IDH-villityypin glioblastooma, IDH-mutantti glioblastooma sijaitsee yleisimmin frontaalilohkossa ja oireet ovat sen mukaisia, eli käytöksen muutoksia ja neurokognitiivisia oireita. Myös paikallisia neurologisia puutteita, kuten hemipareesia ja afasiaa, voi silti esiintyä. IDH-mutantti glioblastooma ei useimmiten aiheuta aivojen turvotusta ja aivopaineen nousua. Histologisesti ei yleensä ole nähtävissä samanlaista nekroosialuetta, kuin IDH-villityypin glioblastoomissa. Sekundaarisissa glioblastoomissa on harvoin EGFR-monistumaa. (7)

Glioblastooma NOS-diagnoosia käytetään, kun IDH-tyypitystä ei ole saatu tehtyä, mutta kasvain muuten muistuttaa glioblastoomaa, eli siitä löydetään tuma-atypiaa, solujen monimuotoisuutta, runsasta mitotoittista aktiivisuutta, diffuusi kasvutapa, mikrovaskulaarinen proliferaatio ja mahdollisesti nekroosia. (7)

1.2.4 Oligodendroglioma, gradus II (IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleatio, NOS)

Graduksen II oligodendroglioma on diffuusisti infiltroiva ja hitaasti kasvava glioma, josta löydetään IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatio ja kromosomien 1p/19q-kodeleatio, paitsi NOS-tapauksissa, joissa molekyyli-tyypitystä ei ole kattavasti saatu tehtyä, ja joissa diagnoosi on asetettu pelkän histologian perusteella. Graduksen II oligodendrogliomia on 1,7 % kaikista primaareista aivotuumoreista ja 5,9 % gliomista. (8)

Tuumorisolut muistuttavat histologisesti oligodendrosyyttejä, sillä niissä on pyöreä tuma ja turvonnut, kirkas solulima. Oligodendrogliomalle ovat tyypillisiä mikrokalkit ja haarautuneet kapillaariverkostot. Mitotoittinen aktiivisuus on vähäistä ja Ki-67 proliferaatioindeksi yleensä alle 5 %. (8)

Kasvain esiintyy pääasiassa aikuisilla ja isoaivoissa, useimmiten frontaalilohkossa. Graduksen II oligodendrogliooma on hyvin erilaistunut kasvain ja sillä on parempi ennuste kuin graduksen III oligodendroglioomalla. Keski-ikä sairastumiselle on 35-44 vuotta ja kasvain esiintyy useammin miehillä kuin naisilla. Kaksi kolmesta potilaasta oireilee epilepsia-kohtauksella ja muita oireita voivat olla päänsärky ja muut aivopaineen kohoamisesta johtuvat oireet, sekä paikalliset neurologiset puutokset ja kognitiiviset ja henkiset muutokset. Graduksen II oligodendroglioomat leviävät viereisiin aivojen osiin, mutta koska ne ovat hitaasti kasvavia, niiden eloonjäämisajannennuste on keskimäärin 11,6 vuotta ja 10 vuoden ennuste eri tutkimuksista riippuen 51-63 %. (8)

1.2.5 Anaplastinen oligodendrogliooma, gradus III (IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleetio, NOS)

Graduksen III anaplastisesta oligodendroglioomasta löytyy IDH 1- tai IDH 2-geenin mutaatio ja 1p/19q-kodeleetio kuten graduksen II oligodendroglioomastakin. Tästäkin on kuitenkin olemassa NOS-kategoria, johon voidaan sijoittaa anaplastista oligodendroglioomaa muistuttavat kasvaimet, joista molekyylligenotyyppitystä ei ole saatu tehtyä. (9)

Histologisesti kasvaimessa on havaittavissa anaplasiaa eli tarkemmin mikrovaskulaarista proliferaatiota ja runsasta mitoitusta aktiivisuutta. Ominaispiirteitä ovat myös runsas solukkuus ja merkittävä sytologinen atypia. Lisäksi voi esiintyä nekroosia. Erottaessa anaplastista oligodendroglioomaa graduksen II oligodendroglioomasta voidaan tarkastella myös MIB-proliferaatioindeksiä, joka on yleensä yli 5 % graduksen III kasvaimissa. Anaplastisen oligodendrogliooman solut muistuttavat oligodendrogliaalisia soluja. Niissä on pyöreä hyperkromaattinen tuma, tumaa ympäröivät kirkastumat ja vähän solu-ulokkeita. Lisäksi niissä on paikallista mikrokalkkeutumaa ja satunnaisesti huomattavaa solujen monimuotoisuutta monitumaisine jättisoluineen. Harvoissa tapauksissa esiintyy myös sarkooma-tyyppisiä alueita. Kasvaimissa voi olla myös haarautuvia kapillaariverkostoja. (9)

Suurin osa anaplastisista oligodendroglioomista on aikuisilla ja ilmaantumisen keski-ikä on 49 vuotta, eli potilaat ovat keskimäärin 6 vuotta vanhempia kuin graduksen II oligodendrogliooma-potilaat. Kasvain on hieman yleisempi miehillä kuin naisilla. Anaplastinen oligodendrogliooma sijaitsee useimmiten frontaalilohkossa. Sitä tavataan myös temporaalilohkossa ja on raportoitu muutamia tapauksia, joissa anaplastinen oligodendrogliooma on sijainnut selkäytimessä. Anaplastisten oligodendroglioomien esiintyvyys on noin 0,11/100 000 henkilöä. Niitä on 0,5 %

kaikista primaarisista aivotuumoreista ja 1/3 oligodendroglialisista kasvaimista. Oireina esiintyy paikallisia neurologisia puutteita, kognitiivisia puutoksia ja merkkejä intrakraniaalipaineen noususta. Myös epilepsia-kohtauksia esiintyy, mutta ne ovat harvinaisempia kuin matalamman asteen oligodendroglioomissa. (9)

Anaplastinen oligodendrogliooma voi kehittyä joko suoraan graduksen III kasvaimeksi tai kehittyä graduksen II oligodendroglioomasta. Keskimääräinen aika, joka kasvaimella kestää kehittyä graduksesta II graduksen III kasvaimeksi on noin 6-7 vuotta. (9)

Aiemmin on osoitettu, että mikäli kasvaimessa on IDH-mutaatio ja 1p/19q-kodelektio, sillä on parempi ennuste kuin kasvaimilla, joissa on pelkkä IDH-mutaatio tai IDH-villityypin genotyyppi, vaikka kaikki olisivat gradusta III. Sen sijaan ei ole varmuutta, onko oligodendrogliomien ennusteella eroa gradusten II ja III välillä, mikäli niitä hoidettaisiin samalla tavalla. Ennen kombinoitua kemoterapiaa, anaplastisen oligodendrogliooman ennuste vaihteli noin 1-3,9 vuoden välillä ja keskimäärin oli noin 3,5 vuotta. Viiden vuoden eloonjäämisennuste oli noin 52,5 % ja 10 vuoden ennuste 39,3 %, mutta nämä tilastot ovat WHO 2007-luokituksen ajalta, jolloin oligodendrogliooman diagnoosi ei edellyttänyt tietoa IDH- ja 1p/19q-kodelektio-statuksista. Uusimpien tutkimusten mukaan potilailla, joiden kasvaimessa on 1p/19q-kodelektio, elinajanennuste on noin 8,5 tai jopa yli 10 vuotta, kun hoitoon sisällytettiin kemoterapia ja PCV-kemoterapia. Potilailla on ylipäätään sitä parempi ennuste, mitä nuorempi on, mitä täydellisemmin kasvaimen resektio on saatu tehtyä ja mitä korkeammat pisteet saa Karnofskyn suorituskykyasteikolla. Myös G-CIMP-status ja MGMT-promoottorimetylaatio ennakoivat parempaa prognoosia. (9)

1.2.6 Sekamuotoinen oligoastroosytooma NOS, gradus II & sekamuotoinen anaplastinen oligoastroosytooma NOS, gradus III

Uuteen 2016 vuoden luokitukseen on jätetty myös sekamuotoisen oligoastroomian diagnoosi epäselville tapauksille, joita ei ole saatu genotyyppitettyä. Oligoastroosytooma on kasvaimena diffuusi gliooma, joka koostuu morfologisesti kahden solutyypin yhdistelmästä, eli muistuttaa sekä oligodendrogliaalista että astroosytääristä kasvainta. Oligoastroosytoomista on olemassa variantteja, joissa oligodendrogliaaliset ja astroosytääriset komponentit sijaitsevat vierekkäin (bifaasinen muoto), sekä variantteja, joissa komponentit ovat sekoittuneet toisiinsa (diffuusi muoto). Oligoastroosytoomat voidaan myös jakaa graduksen II, tai mikäli siitä löydetään anaplastisia piirteitä, graduksen III. Oligoastroosytomat sijaitsevat pääosin isoaivoissa. Kyseessä on nykyisen luokituksen ollessa

voimassa harvinainen diagnoosi, sillä useimmiten kasvaimet pystytään IDH- ja 1p/19q-kodeleetiostatusten perusteella luokittelemaan oligodendroglioomiksi tai astrozytöomiksi. (10)

1.3 Diffuusien gliomien molekyylipatologiaa

1.3.1 Immunohistokemialliset ennustetekijät

1.3.1.1 IDH 1

IDH 1 (isositraattidehydrogenaasi 1) on NADP⁺ riippuvainen entsyymi, joka katalysoi oksidatiivista dekarboksylaatiota, jossa isositraatista muodostuu alfa-ketoglutarattia (alfa-KG). Ihmisen soluissa on myös IDH 2- ja IDH 3-entsyymejä, jotka ovat IDH 1:n isoentsyymejä. IDH 1 toimii sytoplasmassa ja IDH 2 ja IDH 3 mitokondrioissa. (11)

IDH 1-entsyymiä koodaavan geenin mutaatio löydettiin alun perin glioblastoomista, mutta se on yleisin II ja III gradusten glioomissa ja sekundaarisissa glioblastoomissa. IDH 1-geeni sijaitsee kromosomissa 2q33.3 (12). 90 %:ssa IDH 1-mutaatiotapauksista kodonissa 132 argiini vaihtuu histidiiniksi (R132H), mutta mutaatio voi tapahtua myös kodonissa 172 (13). Mutaation seurauksena IDH 1 aktiivisen kohdan rakenne muuttuu ja entsyymin toiminta häiriintyy, jolloin alfa-ketoglutaratin muodostus vähenee. Sen sijaan alfa-KG alkaa muuttua 2-hydroksiglutyraatiksi (2-HG) (14). Ei ole varmasti tiedossa, miten IDH 1 vaikuttaa syövän kehittymiseen, mutta esimerkiksi Dang yms. (15) osoitti tutkimuksessaan, että 2-HG toimii onkometaboliittina ja on siten osallisena gliomien muodostuksessa ja pahanlaatuistumisessa. 2-HG myös kilpailevasti inhiboi alfa-ketoglutarattia ja sen dioksygenaasin entsyymistä aktiivisuutta. Täten dioksygenaasin inhiboinnin on uskottu olevan yksi mekanismi, jolla IDH 1 ja IDH 2-mutaatiot vaikuttavat gliomien patogeneesiin. (16)

IDH 1-mutaatiot korreloivat glioomissa vahvasti paremman ennusteen kanssa. Joissakin tutkimuksissa IDH-mutatoituneilla gliomilla on todettu parempi hoitovaste sädehoidolle ja kemoterapialle verrattuna IDH-villityyppeihin, mutta tästä ei ole yhtenäistä konsensusta. (16) IDH-villityypin graduksen II astrozytöomat kehittyvät useammin korkeamman asteen pahanlaatuisemmiksi astrozytöomiksi (17).

1.3.1.2 ATRX

ATRX-geenin (alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) mutaatiota esiintyy usein diffuuseissa ja anaplastisissa astrozytoomissa ja useimmiten yhdessä IDH 1:n kanssa. Sitä tavataan vain harvoin 1p/19q-kodelektion kanssa samassa tuumorissa (18). ATRX:ää koodaava geeni sijaitsee X-kromosomissa kohdassa q21.1 ja se osallistuu moniin solun toimintoihin, kuten DNA:n rekombinaatioon, korjaamiseen ja transkription säätelyyn. Kun ATRX -proteiini muodostaa DAXX-proteiinin kanssa kompleksin, ne toimivat saperonina histonivariantin H3.3 laskostumisessa heterokromatiiniksi. (19) ATRX:ää tarvitaan muun muassa H3.3:n liittämiseksi telomeereihin (20). Tämän geenin mutaatiot ovat pääosin inaktivoivia eli estävät proteiinin normaalin ilmentymisen. Ne on liitetty mm. kromatiinin laskostumisen virheisiin, epänormaaliin DNA:n metylaatioon ja ALT-fenotyyppiin (Alternative Lengthening of Telomeres), jossa telomeerit pitenevät ilman telomeraasi-entsyymi aktiivisuutta. (19)

ATRX-mutaatio yhdessä IDH 1-geenin mutaation kanssa on yhdistetty parempaan elinajanennusteeseen, kuin pelkkä IDH-mutaatio (21).

1.3.1.3 p53

p53 on kasvunrajoitegeeni, jonka tuottaman proteiinin tehtävänä on muun muassa säädellä solunjakautumista ja apoptoosia DNA-vaurioissa (22). p53-geenin sijaitsee kromosomissa seitsemän ja sen mutaatioita tavataan jopa puolessa ihmisten syöpätapauksista. Kyseinen mutaatio tapahtuu varhaisessa syövänkehityksen vaiheessa ja johtaa mutatoituneen p53-proteiiniin kertymiseen. (22,23)

p53-geenin mutaatio on yleinen astrozyttärisissä kasvaimissa ja se havaitaan 95 %:lla tapauksista, joissa ilmenee IDH-mutaatio, mutta ei 1p/19q kodelektiota. p53 ei kuitenkaan ole diagnostisesti spesifinen, sillä se saattaa esiintyä myös muissa gliaalisissa tuumoreissa, kuten primaarisissa glioblastoomissa ja 1p/19q kodelektion omaavissa tuumoreissa, vaikka onkin näissä harvinainen. (24) Positiivinen immunohistokemiallinen värjäytyminen ei ole välttämättä mutaatio, sillä sen voi aiheuttaa myös villityypin yli-ilmentyminen. p53-geenin mutaatioilla ei ole havaittu olevan vaikutusta tuumoripotilaiden elinajanennusteeseen. (22)

1.3.1.4 EGFR

Epidermaalisen solukalvon läpäisevän tyrosiinikinaasi kasvutekijäreseptorin, eli EGFR:n, monistuma on yleisin geneettinen muutos primaarisissa glioblastoomissa, sillä se voidaan havaita noin 40 %:ssa tapauksista (25). EGFR-reseptori aktivoituu, kun ulkoinen ligandi sitoutuu siihen, jolloin tapahtuu reseptorin autofosforylaatio ja solunsisäisten signaalijärjestelmien aktivoituminen. Tämä vaikuttaa solunjakautumiseen, angiogeneesiin ja geenien transkriptioon sekä apoptoosiin. Geenimonistuman lisäksi 50-60 %:ssa EGFR:ää yliekspressoivissa glioblastoomissa esiintyy myös EGFR-geenin mutaatio EGFRvIII. Kyseisessä mutaatiomuodossa ligandia sitova osa on lyhentynyt, jolloin se ei pysty kiinnittymään oikealla tavalla EGFR:n ligandeihin. EGFRvIII saa aikaan pysyvän tyrosiinikinaasiaktiivisuuden ja tämän vuoksi mutatoituneiden reseptorien inhibitioon on yritetty käyttää tyrosiinikinaasi-inhibiittoreita vaihtelevalla menestyksellä. EGFRvIII-positiiviset tuumorit on yhdistetty huonoon ennusteeseen ja lyhyempään elinajanodotteeseen ja sekä EGFR että EGFRvIII glioblastoomassa ennustavat sen invasiivisempaa käyttäytymistä ja lisääntynyttä angiogeneesiä. EGFR-monistuman merkitys glioblastoomien eloonjäämisajanennusteeseen on epäselvä. (26)

1.3.1.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi

Ki-67 on IgG1-luokan monoklonaalinen vasta-aine, joka löydettiin vuonna 1983 (27). Sen tarkka tehtävä on toistaiseksi epäselvä. Ki-67 tunnistaa proliferoivissa soluissa esiintyvän pinta-antigeenin, joka on ekspressoituna kaikissa solusyklin vaiheissa paitsi G0:ssa, eli kun solusykli on pysähtynyt, ja G1-vaiheen alussa, kun solu on vasta aloittamassa interfaasia. Ekspressoidun antigeenin määrä vaihtelee solusyklin eri vaiheissa. (28)

Aikaisemmin ongelmana oli, että Ki-67 voitiin osoittaa vain tuoreesta tai jäädytetystä kudoksesta. Kun kuitenkin huomattiin, että MIB-1-vasta-aine tunnistaa Ki-67-vasta-aineen myös formaliinifiksoidusta tai parafiininsisäisestä kudoksesta, on Ki-67 arvo diagnostiikassa lisääntynyt, sillä nyt voidaan helpommin tutkia Ki-67:n kliinistä arvoa proliferaation markerina. (29)

Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että Ki-67-proliferaatioindeksi on sitä korkeampi, mitä pahanlaatuisemmasta tuumorista on kyse. On myös osoitettu, että etenkin astrocytäärisissä kasvaimissa kyseinen proliferaatioindeksi kertoo kasvaimen prognoosista sekä uusiutumisen että eloonjäämisen suhteen. Proliferaatioindeksiä ei voida kuitenkaan pitää yksinään diagnostisena

tekijänä, sillä siinä on paljon yksittäistä tapauskohtaista vaihtelua. Yli 10 % proliferaatioindeksiä pidetään merkinä siitä, että kasvaimen maligneettipotentiaali on kohonnut. (28)

1.3.2 Kromosomaaliset ennustetekijät

1.3.2.1 1p/19q kodeleetio

1p/19q kodeleetiossa sekä kromosomin 1 lyhyt p-käsivarsi että kromosomin 19 pitkä q-käsivarsi ovat hävinneet. Sitä tavataan lähes pelkästään yhdessä IDH-mutaation kanssa. 1p/19q kodeleetio yhdistettiin ensimmäisen kerran oligodendroglioomiin vuonna 1994 ja jälkeenpäin sen huomattiin parantavan hoitovastetta kemoterapialle. (24) Samanlaista ennusteen paranemista ei ole havaittu, mikäli tuumorissa on vain jompikumpi kyseistä deleetioista. 1p/19q-kodeleetio antaa paremman prognoosin kasvaimelle myös ilman hoitoa, kun verrataan kasvaimiin joissa on vain IDH-mutaatio- tai IDH-villityyppi-genotyyppi. (30)

1p/19q-kodeleetiostatus voidaan testata joko FISH-tekniikalla, PCR-pohjaisella mikrosatelliitti analyysillä tai käyttämällä uusia metodeja, kuten vertailevaa genomista hybridisaatiota (CGH) (30).

1.4 Diffuusien gliomien hoito

WHO-luokituksen graduksen I kasvaimet, joita tavataan yleensä lapsilla (esimerkiksi pilosyyttinen astrozytooma, joka ei ole diffuusi gliooma), ovat useimmiten kirurgisesti poistettavissa kokonaan. Diffuusisti infiltroiva kasvutapa tekee gradusten II-IV kasvainten kokonaispoiston hankalaksi ja siksi ne usein uusiutuvat ja lisäksi muuttuvat progressiivisesti pahanlaatuisemmiksi.

Matalamman asteen (gradus II) glioomissa kokonais- tai osapoistoleikkaus on suositeltu hoitomuoto ja se parantaa ennustetta. Korkean riskin potilaat (ikä yli 40 ja kasvain osittain poistettu) hyötyvät lisäksi leikkauksen jälkeisestä kemoterapiasta erityisesti mikäli kasvain on IDH-mutatoitunut ja 1p/19q-kodeletoitunut oligodendrogliooma. Vaikka graduksen II glioomat eivät ole hyvänlaatuisia tuumoreita, on osoitettu, että keskimääräinen jäljellä oleva elinaika voi pidentyä jopa kaksinkertaiseksi, mikäli hoito suunnitellaan tilanteeseen sopivaksi ja aloitetaan ajoissa. (31)

Korkeamman asteen gliomien (gradukset III ja IV) ennuste on hoidosta riippumatta huono. Niissäkin pyritään silti niin suureen osapoistoon, kuin vain mahdollista ja turvallista. Tähän lisätään yleensä potilaan kunnon salliessa kemosaädehoito, eli potilaalle annetaan sädehoitoa sekä kemoterapiahoitoa useimmiten temozolomidillä. Tämä parantaa jonkin verran elinajanennustetta.

Hoitona voidaan käyttää myös joko pelkkää säde- tai sytostaattihoitoa. Hoitolinjan valinta riippuu potilaan iästä, toimintakyvystä, siitä kuinka paljon kasvainta saadaan poistettua sekä kasvaimen biomarkkereista, histologiasta ja gradukselta. (32)

1.5 Tutkimuksen tavoitteet

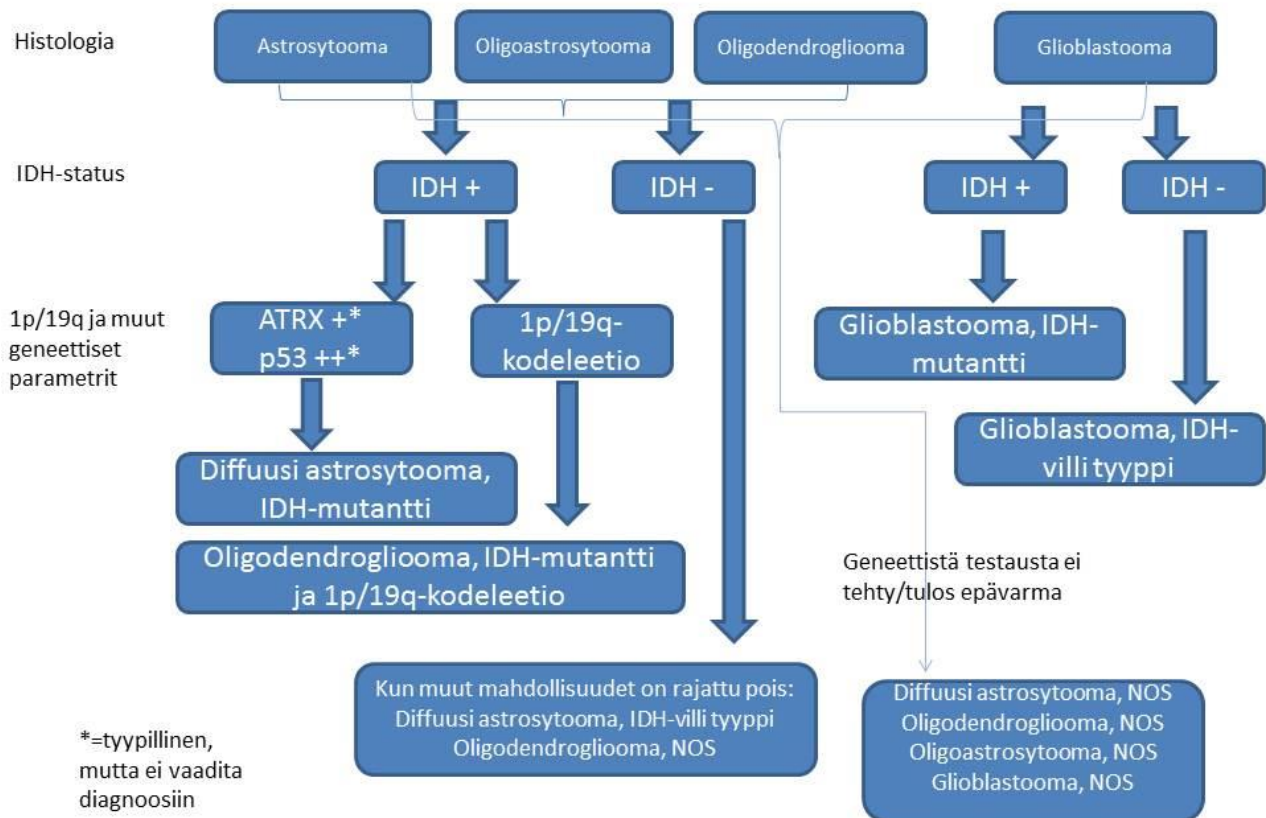
Tutkimuksen tavoitteena oli luokitella diffuusit glioomat WHO 2016-luokittelukriteerien perusteella ja verrata vanhaa vuoden 2007 luokittelua uuteen. Tavoitteena oli selvittää, antaako uusi luokitus tarkemman prognostisen arvon kasvainpotilaille verrattuna vanhaan luokitteluun. Lisäksi kasvaimet luokiteltiin TCGA-luokituksen (The Cancer Genome Atlas) mukaisesti, ja sen antamaa ennustearvoa verrattiin WHO 2016- ja 2007-luokitukseen. (33) Tavoitteena oli myös tutkia immunohistokemiallisten ennustetekijöiden vaikutusta kasvainpotilaiden eloonjäämiseen.

AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Kasvainluokitukset

2.1.1 WHO 2016-kasvainluokituksen mukainen jaottelu

Kuten aiemmin on kuvattu, WHO 2016-luokituksessa kasvaimet diagnosoidaan integroidusti niiden fenotyypin ja genotyypin perusteella. Kaavion 1 mukaisesti kasvainta genotyypittäessä katsotaan ensin IDH 1-/IDH 2-status. Kaaviossa IDH-mutaatio on merkitty plusmerkillä ja IDH-villityyppi miinusmerkillä. Tämän jälkeen selvitetään mahdollinen 1p/19q-kodeletio. Mikäli se löytyy, luokitellaan kasvain oligodendrogliomaksi. Jos deleetiota ei löydy, mutta IDH-mutaatiostatus on selvillä, luokitellaan kasvain joko IDH-villityypin diffuusiksi astosytoomaksi tai IDH-mutantiksi diffuusiksi astrosytoomaksi. Kasvaimesta tarkastetaan myös ATRX- ja p53-mutaatiot (kaaviossa merkitty plusmerkillä). Nämä tukevat diffuusin astrosytooman diagnoosia, mutta eivät ole sille välttämättömiä. Histologialtaan graduksen IV kasvaimet luokitellaan glioblastoomiksi, ja IDH-statusen perusteella joko IDH-mutanteiksi tai IDH-villityypin glioblastoomiksi. Mikäli IDH-statusta ei ole tiedossa, käytetään NOS-kategoriaa. Tässä tutkimuksessa luokiteltiin vain ne kasvaimet, joissa IDH-status tai 1p/19q-kodeletio oli tiedossa, joten aineistossa ei ole mukana ollenkaan NOS-luokiteltuja kasvaimia.



Kaavio 1. WHO 2016-luokituksen mukainen kaavio diffuusien gliomien luokitteluun perustuen kasvaimen histologisiin ja geneettisiin ominaisuuksiin.

2.1.2 TCGA-ryhmien mukainen luokittelu

TCGA-ryhmien mukaiseen luokitteluun otettiin mukaan gradusten II ja III tuumoreista vain ne, joista oli tiedossa sekä IDH 1- että 1p/19q-status. Graduksen IV tuumoreista riitti, että oli tiedossa IDH 1-status. Mukaan otettiin vain aineiston primaarituumorit. (33)

Tuumorit jaettiin viiteen luokkaan. Luokkaan 1 sijoitettiin gradusten II ja III tuumorit, joissa oli IDH 1-mutaatio ja 1p/19q-kodeleetio, luokkaan 2 gradusten II ja III tuumorit, joissa oli IDH 1-mutaatio, mutta ei 1p/19q-kodeleetiota ja luokkaan 3 gradusten II ja III tuumorit, joissa ei ollut IDH 1-mutaatiota eikä 1p/19q-kodeleetiota. Glioblastoomat jaettiin niin, että luokkaan 4 sijoitettiin ne, joissa oli IDH 1-mutaatio ja luokkaan 5 IDH-villityypin glioblastoomat. TCGA-luokittelun perusteella lajiteltuun materiaaliin sisältyi 208 tuumoria.

2.2 Potilasaineisto

Tutkimuksen potilasaineisto käsitti yhteensä 376 vuosina 2006–2016 Tampereen yliopistollisessa sairaalassa (TAYS) leikattua potilasta. Leikatuista tuumoreista primaarisia oli 269 (taulukko 2).

Tutkimusaineisto rajautui vuoteen 2006, sillä siitä lähtien TAYS:ssa/Fimlabissa on kattavasti suoritettu kliinistä 1p/19q-analytiikkaa. Taulukoissa 3 ja 4 on eriteltyä tutkimusaineiston primaarituumoreiden diagnoosit vanhan ja uuden luokituksen mukaisesti.

| Astrosytääriset | | | | |
|---------------------------|--------------------|-------|---|-------------------------------|
| | (gradus II ja III) | | Oligodendrogliaaliset (gradus II ja III) | Glioblastoomat (gradus IV) |
| | Kaikki | III) | | |
| Tuumorileikkaukset | 376 | 97 | 100 | 179 |
| Primaarituumorit | 269 | 66 | 58 | 145 |
| Sukupuoli | | | | |
| mies | 145 | 35 | 29 | 81 |
| nainen | 124 | 31 | 29 | 64 |
| Ikä | | | | |
| keskiarvo | 55,05 | 47,24 | 46,62 | 61,97 |
| keskihajonta | 14,58 | 16,22 | 12,58 | 10,46 |
| mediaani | 58 | 45 | 46,5 | 62 |
| nuorin | 19 | 19 | 24 | 21 |
| vanhin | 83 | 83 | 77 | 79 |

Taulukko 2. WHO 2016-luokiteltujen tutkimuksessa mukana olleiden primaarituumoripotilaiden sukupuoli ja ikä. Tutkimuksen nuorin primaarituumoripotilas oli 19-vuotias ja vanhin 83-vuotias ja heillä molemmilla oli astrosytäärinen (gr II tai III) kasvain.

| Diagnoosi | Potilaiden määrä |
|---------------------------|------------------|
| Astrozytoma, gr II | 19 |
| Astrozytoma, gr III | 21 |
| Glioblastoma, gr IV | 145 |
| Oligodendroglioma, gr II | 34 |
| Oligodendroglioma, gr III | 24 |
| Oligoastrozytoma, gr II | 19 |
| Oligoastrozytoma, gr III | 7 |
| Summa | 269 |

Taulukko 3. WHO 2007-luokiteltujen primaarituumorien diagnoosit.

| Diagnoosi | Potilaiden määrä |
|--|------------------|
| Astrozytoma, gr II, IDH-mut | 26 |
| Astrozytoma, gr II, IDH-wt | 11 |
| Astrozytoma, gr III, IDH-mut | 15 |
| Astrozytoma, gr III, IDH-wt | 14 |
| Glioblastoma, gr IV, IDH-wt | 140 |
| Glioblastoma, gr IV, IDH-mut | 5 |
| Oligodendroglioma, gr II, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 35 |
| Oligodendroglioma, gr III, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 23 |
| Summa | 269 |

Taulukko 4. WHO 2016-luokiteltujen primaarituumorien diagnoosit.

2.3 Immunohistokemialliset menetelmät

2.3.1 IDH 1

IDH1-R132H – mutaation osoittamiseen käytettiin hiiren R132H-spesifistä monoklonaalista vastaainetta (Dianova GmbH, Hampuri, Saksa). Immunovärijäys tehtiin automatisoidusti Bondmax

immunovärillä (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle upon Tyne, Yhdistyneet Kuningaskunnat). Deparaffinisaatioon käytettiin Bond Dewax Soluton-liuosta (katalogi no. AR9222). Epitopppikeräykseen käytettiin RTU Epitope Retrieval Solution 1-liuosta, pH 5,9–6,1 (katalogi no. AR9961), 30 minuutin ajan 100 °C:ssa. Kudosleikkeitä inkuboitii 30 minuuttia huoneenlämmössä IDH1-R132H-pistemutaatiospesifin vasta-aineen kanssa (laimennos 1:50). Leimaustarvikkeina käytettiin Bond Refine Detection-kittiä. Eri osioiden välissä näytteet huuhdeltiin Bond Wash Solution-liuoksella (katalogi No. AR9590).

2.3.2 ATRX

ATRX-mutaation osoittamiseen käytettiin kanin polyklonaalista anti-ATRX-vasta-ainetta (Atlas Antibodies HPA001906). Kudosleikkeet kiinnitettiin 60°C:ssa lämpölevyllä tunnin ajan. Värjäys tehtiin Ventana Benchmarks GX –värjäysautomaatilla. Paraffiinin poistoon käytettiin Ventana EZ Prep solution-liuosta ja epitopppikeräykseen Ventana CC1-liuosta 92 minuutin ajan. Kudosleikkeitä inkuboitii polyklonaalisen ATRX-vasta-aineen kanssa (laimennos 1:500) tunnin ajan 37°C:ssa, laimennettuna Ventana-laimennospuskuriin. Kudosleikkeet pestiin Ventana Reaction Buffer solution-liuoksella. Mutanttiproteiini osoitettiin Ventana OptiView DAB IHC Detection-kitin avulla.

2.3.3 p53

Immunohistokemiallisia analyysejä varten leikattiin 5 µm:n paksuiset näytteet rutiinisti käsitellyistä kudosleikkeistä ja upotettiin SuperFrost, SuperFrost Plus tai poly-L-lysiinillä päällysteille laselle ja kuivattiin niissä yön yli 37 °C:ssa. Tämän jälkeen leikkeet deparaffinoitiin ja rehydroitiin. Antigeenien esillesaanti tehtiin lämmittämällä leikkeitä mikroaaltounissa 2 x 7 minuuttia 0,1 mol/l sitraattipuskurissa (pH 6,0). Tämän jälkeen leikkeitä inkuboitii primaaristen vasta-aineiden kanssa 25 minuuttia huoneenlämmössä. Vasta-aineena käytettiin clone DO-7:aa (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK, laimennus 1:40). Sidotut vasta-aineet visualisoitiin käyttämällä sopivaa streptavin-biotiini-peroksidaasi kittiä (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ja diaminobenziiniä kromogeeninä.

2.3.4 EGFR CISH

EGFR-geenin määrä arvioitiin CISH-menetelmän avulla. Tuumorileikkeet deparaffinoitiin ja lämpökäsiteltiin Tris-HCl-lioksessa (pH 7.0) mikroaaltouunissa (92 °C:ssa 10 min).

Pepsiinidigestion (10 min huoneen lämmössä käyttäen Digest-All III, Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) jälkeen leikkeet pestiin fosfaattipuskuroidulla suolavedelle (PBS) ja dehydroitiin etanolilla, jonka konsentraatiota asteittain vähennettiin. Käyttövalmis digoksigeenileimattu EGFR DNA-koetin (Zomed) lisättiin leikkeisiin ja ne peitettiin ja tämän jälkeen denaturoitiin lämpölevyllä (94 °C:ssa 3 min). Leikkeitä hybridisoitiin yli yön 37 °C:ssa, jonka jälkeen ne pestiin 0,5 x SSC-liuoksella (standardoitu saliini sitraatti, 5 min 75 °C:ssa) ja vielä kolme kertaa PBS:ssällä huoneenlämmössä. EGFR-koetin tunnistettiin ikuboimalla hiiren antidigoksigeenillä (laimennettu 1:300; Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) ja Powervision+immunoperoksidaasi kitin reagensseillä (Immunovision Inc., Daly City, CA, USA). Kromogeeninä käytettiin diaminobenzidiiniä. Leikkeet vastavärjättiin hematoxyliinillä. Positiiviset ja negatiiviset kontrollit sisällytettiin jokaiseen hybridisaatioarjaan. Leikkeet arvioitiin käyttämällä x40 kuivaobjektiivia. Ei-monistuneeksi geenimääräksi sovittiin 1-5 signaalia tumaa kohden. Monistumaksi määriteltiin kuusi tai enemmän signaalia tumaa kohden yli 50 %:ssa syöpäsoluista tai kun havaittiin laaja geenikopioklusteri.

2.3.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi

Formalinifiksoiduista ja paraffiiniin pedatuista kudosebloeista leikattiin noin 5 mikrometrin paksuiset leikkeet. Leikkeitä kiinnitettiin 56 °C:ssa lämpölevyllä yhden tunnin ajan, jonka jälkeen ne deparaffinoitiin xyleenillä, rehydroitiin alkoholisarjassa ja esikäsiteltiin Tris-EDTA-puskurissa (pH 9,0) mikroaaltouunissa (850 W, 2 x 7 min). Leikkeet värjättiin Techmate TM 500 Plus-automaatilla (Dako, Denmark) ENVP-ohjelmalla. Primaarivasta-aineena käytettiin MIB-1:tä (Dako, Denmark) laimennoksena 1:110 ja positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä. Tumavärinä käytettiin CAS-200- kuva-analyysiä varten 0,03-prosenttista metyyliivihreää. ImmunoRatio-analyysiä, jonka kokonaisuus koostuu Olympus BH-2-mikroskoopista, Scion Grayscale digitaalikamerasta (malli CFW-1612C) ja ImmunoRatio-ohjelmasta, varten objektilasilla oleva kudoslaike kuvattiin kokonaisuudessaan eli skannattiin pienellä suurennoksella tietokoneelle. Tämän jälkeen näytettä voitiin tarkastella tietokoneen ruudulta erilaisilla suurennoksilla. Tässä tutkimuksessa skannaamiseen käytettiin Scanscope XT (Aperio)-virtuaalimikroskooppilaitetta. ImmunoRatio-ohjelmaan perustuva kuva-analyysi suoritettiin monikudosblokin kudoslieriöistä siten, että määritettiin koko kudoslieriön alan mittaus (200-kertainen suurennos).

2.4 Kromosomaaliset ennustetekijät

2.4.1 1p/19q-kodeleetio

1p/19q-kodeleetiostatus analysoitiin FISH-menetelmällä. Aluksi paraffiiniin upotetut tuumorileikkeet deparaffinoitiin xyleenillä ja tämän jälkeen etanolilla, jonka konsentraatiota asteittain vähennettiin. Leikkeet siirrettiin tislattuun veteen, jonka jälkeen niitä inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuuttia 0,1-prosenttisen proteaasin kanssa 0,1-molaarisessa Tris-liuoksessa ja 0,07-molaarisessa NaCl-liuoksessa, välillä sekoittaen. Tiheyttä tarkasteltiin tutkimalla 5µl solususpensiota mikroskoopin alla. Preparaatit valmistettiin käyttäen 10 µl solususpensiota, ja niiden annettiin kuivua yön yli huoneenlämmössä. Preparaatteja fiksoitiin 4-prosenttisella puskuroidulla formaldehydillä 10 minuutin ajan. Preparaatit joko käytettiin välittömästi tai säilytettiin -70 °C:ssa. FISH-analyysi 1p:lle ja 19q:lle suoritettiin käyttäen LSI 1p36/LSI 19q25 ja LSI 19q13/LSI 19p13 koettimia (Vysis). Hybridisaatio suoritettiin pakkauksen ohjeen mukaisesti. Testikoettimet leimattiin punaisella ja verrokkit vihreällä fluoresenssivärillä. Kodeleetio havaittiin siten, että punaisia hybridisaatiosignaaleja havaittiin kaksi, kun verrokkisignaaleja havaittiin neljä.

2.5 Tilastolliset menetelmät

Aineistot analysoitiin IBM Statistics 22-ohjelmalla (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Analyyseissä käytettiin Chi-neliö-, Kalpan-Meier-, log-rank- ja Kruskal-Wallis-testejä sekä Coxin monimuuttujamallia.

TULOKSET

3.1 Kliinispatologisten muuttujien keskinäiset suhteet

Tutkimuksessa mukana olleista 376 potilaasta kaikki ne, joista molekyyli-data oli kyseisen parametrin kohdalta saatavilla, luokiteltiin sen mukaisesti. Taulukossa 5 on esitetty kaikki aineiston tuumorit ja taulukoissa 6,7 ja 8 tuumorit jaoteltuna gradusten II ja III astrozyttäreihin ja oligodendrogliaalisiin sekä graduksen IV glioblastoomiin.

| Kaikki tuumorit | Potilaiden määrä |
|-----------------------|------------------|
| Operaatio | |
| primaari | 269 |
| residiivi 2 | 76 |
| residiivi 3 | 24 |
| residiivi 4 | 5 |
| residiivi 5 | 1 |
| residiivi 6 | 1 |
| IDH 1 | |
| mutaatio | 133 |
| ei mutaatiota | 180 |
| ATRX | |
| mutaatio | 33 |
| ei mutaatiota | 144 |
| 1p/19q | |
| kodeleetio | 71 |
| 1p deletio | 2 |
| 19q deletio | 8 |
| ei deletiota | 22 |
| ei kodeleetiota | 32 |
| p53 | |
| yliekspressio (++) | 156 |
| ekspressio (+) | 8 |
| negatiivinen (-) | 43 |
| EGFR CISH | |
| monistuma | 58 |
| ei monistumaa | 95 |

Taulukko 5. Kasvainleikkausten ja molekyylipatologisten muuttujien määrät koko aineistossa.

Molekyylipatologisissa muuttujissa on mukana kaikki aineiston kasvaimet, joista kyseiset parametrit on määritetty. IDH 1-mutaatio oli tutkittu 313 kasvaimesta ja niitä oli 133 kappaletta (42 %). ATRX-mutaatio puolestaan oli tutkittu 177 kasvaimesta ja se löytyi 33:sta (19 %). 1p/19q-status oli tutkittu 103 kasvaimesta, joista 71:ssä oli kodeleetio (69 %). p53:n ekspressoitumista oli

tutkittu 207 kasvaimesta ja se oli yliekspressoitunut 156:ssa (75 %). EGFR-monistumaa oli tutkittu 153 kasvaimesta ja niitä löytyi 58 kappaletta (38 %).

| Astrozyttäriset (Gradus II ja III) | Potilaiden määrä |
|------------------------------------|------------------|
| Operaatio | |
| primaari | 66 |
| residiivi 2 | 22 |
| residiivi 3 | 8 |
| residiivi 4 | 1 |
| IDH 1 | |
| mutaatio | 59 |
| ei mutaatiota | 27 |
| ATRX | |
| mutaatio | 27 |
| ei mutaatiota | 17 |
| p53 | |
| yliekspressio (++) | 43 |
| ekspressio (+) | 3 |
| negatiivinen (-) | 6 |

Taulukko 6. Kasvainleikkausten ja molekyylipatologisten muuttujien määrät gradusten II ja III astrozyttärisissä kasvaimissa. Molekyylipatologisissa muuttujissa on mukana kaikki aineiston astrozyttäriset (gr II ja III) kasvaimet, joista kyseiset parametrit on määritetty. IDH 1-mutaatio oli tutkittu 86 tapauksessa ja niitä löytyi 59 kappaletta (69 %). ATRX –mutaatio oli tutkittu 44 tuumorista ja se oli niistä 27:ssä (61 %). p53:n ekspressoitumista oli tutkittu 52 tapauksista, joista 43:ssa (83 %) se oli yliekspressoitunut.

| Oligodendrogliaaliset (Gradus II ja III) | Potilaiden määrä |
|--|------------------|
| Operaatio | |
| primaari | 58 |
| residiivi 2 | 29 |
| residiivi 3 | 7 |
| residiivi 4 | 4 |
| residiivi 5 | 1 |
| residiivi 6 | 1 |
| ATRX | |
| mutaatio | 3 |
| ei mutaatiota | 55 |
| p53 | |
| yliekspressio (++) | 6 |
| ekspressio (+) | 2 |
| negatiivinen (-) | 12 |

Taulukko 7. Kasvainleikkausten ja molekyylipatologisten muuttujien määrät gradusten II ja III oligodendrogliaalisissa kasvaimissa. Molekyylipatologisissa muuttujissa on mukana kaikki aineiston oligodendrogliaalisissa kasvaimet, joista kyseiset parametrit on määritetty. ATRX-mutaatio oli tutkittu 58 kasvaimesta ja se löytyi kolmesta (5 %). p53:n ekspressoitumista oli tutkittu 20 kasvaimesta, ja se oli yliekspressoitunut kuudessa tapauksessa (30 %).

| Glioblastoomat (Gradus IV) | Potilaiden määrä |
|-----------------------------------|-------------------------|
| Operaatio | |
| primaari | 145 |
| residiivi 2 | 25 |
| residiivi 3 | 9 |
| IDH 1 | |
| mutaatio | 10 |
| ei mutaatiota | 148 |
| ATRX | |
| mutaatio | 3 |
| ei mutaatiota | 72 |
| p53 | |
| yliekspressio (++) | 107 |
| ekspressio (+) | 3 |
| negatiivinen (-) | 25 |
| EGFR CISH | |
| monistuma | 52 |
| ei monistumaa | 81 |

Taulukko 8. Kasvainleikkausten ja molekyylipatologisten muuttujien määrät graduksen IV glioblastoomissa. Molekyylipatologisissa muuttujissa on mukana kaikki glioblastoomat, joista kyseiset parametrit on määritetty. IDH 1-mutaatio oli tutkittu 158 tapauksessa ja niitä löytyi 10 kappaletta (6 %). ATRX-mutaatio puolestaan oli tutkittu 75 kasvaimesta ja se oli kolmessa niistä (4 %). p53:n ekspressoitumista oli tutkittu 135 tapauksessa, joista 107:ssä (79 %) oli yliekspressiota. EGFR-monistumaa oli tutkittu 133 kasvaimesta CISH-menetelmällä ja se löytyi 52:sta (39 %) kasvaimesta.

3.2 Kasvainten jakautuminen WHO 2007- ja WHO 2016-luokitteluissa

Kasvaimet jaoteltiin WHO 2016-luokitteluperusteiden mukaisesti (kaavio 1) siten, että ne, joissa oli 1p/19q-kodeleetio, luokiteltiin oligodendroglioomiksi, vaikka IDH-status olisi puuttunut tai mahdollisesti epäluotettavasti määritetty. Ne, joissa kodeleetiota ei ollut, luokiteltiin IDH-statuksen

perusteella joko IDH-mutanteiksi tai IDH-villityypeiksi graduksen II ja III astrozytomaiksi ja graduksen IV glioblastomaiksi.

Taulukoissa 9 ja 10 on jaoteltuna aineiston primaarituumorit. Taulukosta 9 nähdään, että graduksen II oligodendrogliomista (O2, N=34) yksi muuttui graduksen II IDH-mutantti astrozytomaksi (A2, IDH-mut) ja yksi graduksen II IDH-villityyppi astrozytomaksi (A2, IDH-wt). Graduksen III oligodendrogliomista (O3, N=24) kolme muuttui graduksen III IDH-mutantti astrozytomaksi (A3, IDH-mut) ja kaksi graduksen III IDH-villityyppi astrozytomaksi (A3, IDH-wt). Tarkennetuissa tutkimuksissa muutama astrozytoma vaihtoi gradusta. Graduksen III astrozytomista (A3, N=21) yksi muuttui graduksen III oligodendrogliomaksi (O3, IDH-mut ja 1p/19q-kodel).

Taulukosta 10 nähdään, miten oligoastrozytomat (N=26) jakautuivat astrozytomiksi ja oligodendrogliomiksi. Graduksen II oligoastrozytomista (MOA2, N=19) 13 muuttui graduksen II IDH-mutantti astrozytomaksi (A2, IDH-mut), kolme graduksen II IDH-villityyppi astrozytomaksi (A3, IDH-wt) ja kolme graduksen II oligodendrogliomaksi (O2, IDH-mut ja 1p/19q-kodel). Graduksen III oligoastrozytomista (MOA3, N=7) neljä muuttui graduksen III IDH-mutantti astrozytomiksi (A3, IDH-mut) ja kolme graduksen III oligodendrogliomiksi (O3, IDH-mut ja 1p/19q-kodel).

| | WHO 2007 A2 | WHO 2007 A3 | WHO 2007 GBM | WHO 2007 O2 | WHO 2007 O3 |
|---|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| WHO 2016 A2, IDH-mut | 10 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| WHO 2016 A2, IDH-wt | 7 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| WHO 2016 A3, IDH-mut | 2 | 6 | 0 | 0 | 3 |
| WHO 2016 A3, IDH-wt | 0 | 12 | 0 | 0 | 2 |
| WHO 2016 GBM, IDH-wt | 0 | 0 | 140 | 0 | 0 |
| WHO 2016 GBM, IDH-mut | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| WHO 2016 O2, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 |
| WHO 2016 O3, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 0 | 1 | 0 | 0 | 19 |
| Summa | 19 | 21 | 145 | 34 | 24 |

Taulukko 9. Vanhat WHO 2007:n mukaiset diagnoosit jaoteltuna uusiksi WHO 2016-diagnooseiksi. Mukana vain primaarituumorit.

| | WHO 2007 MOA2 | WHO 2016 MOA3 |
|---|------------------|------------------|
| WHO 2016 A2, IDH-mut | 13 | 0 |
| WHO 2016 A2, IDH-wt | 3 | 0 |
| WHO 2016 A3, IDH-mut | 0 | 4 |
| WHO 2016 A3, IDH-wt | 0 | 0 |
| WHO 2016 GBM, IDH-wt | 0 | 0 |
| WHO 2016 GBM, IDH-mut | 0 | 0 |
| WHO 2016 O2, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 3 | 0 |
| WHO 2016 O3, IDH-mut ja 1p/19q-kodel | 0 | 3 |
| Summa | 19 | 7 |

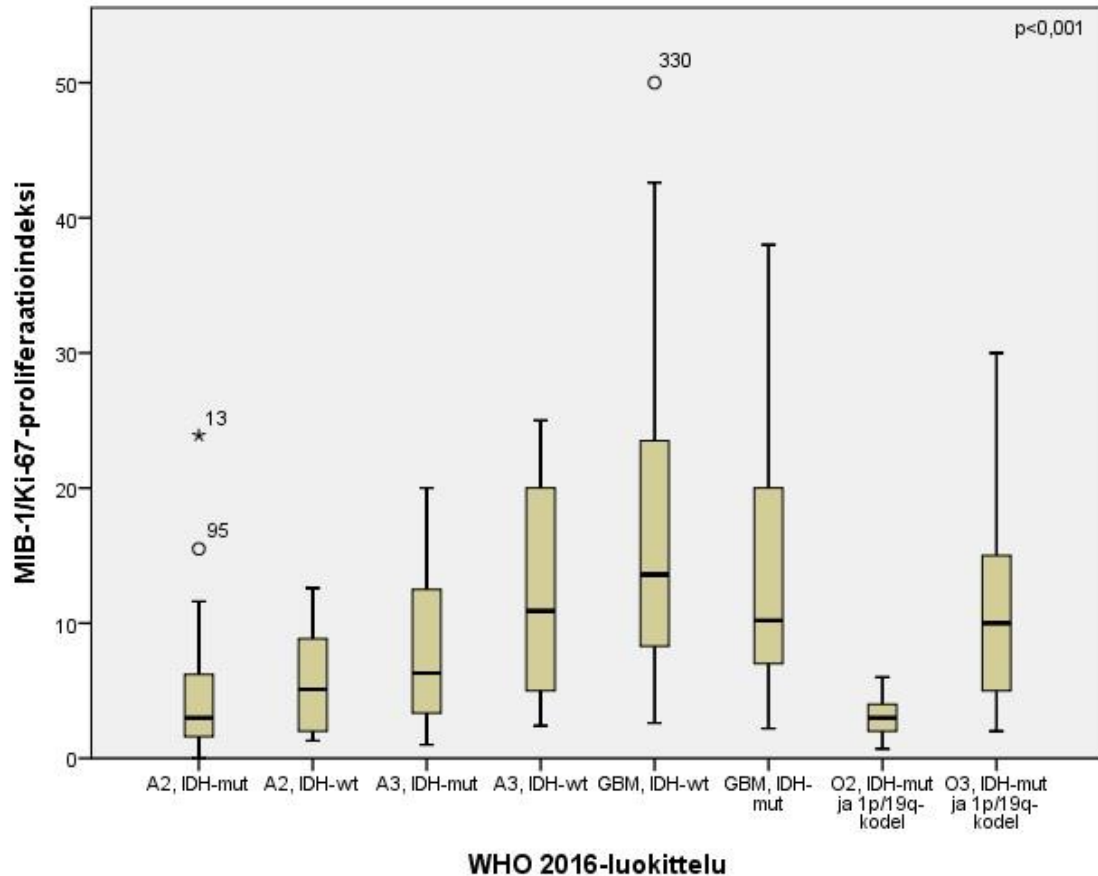
Taulukko 10. Vanhat WHO 2007:n mukaiset oligoastroosytoomat jaoteltuna uusiksi WHO 2016-diagnooseiksi. Mukana vain primaarituumorit.

3.3 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi

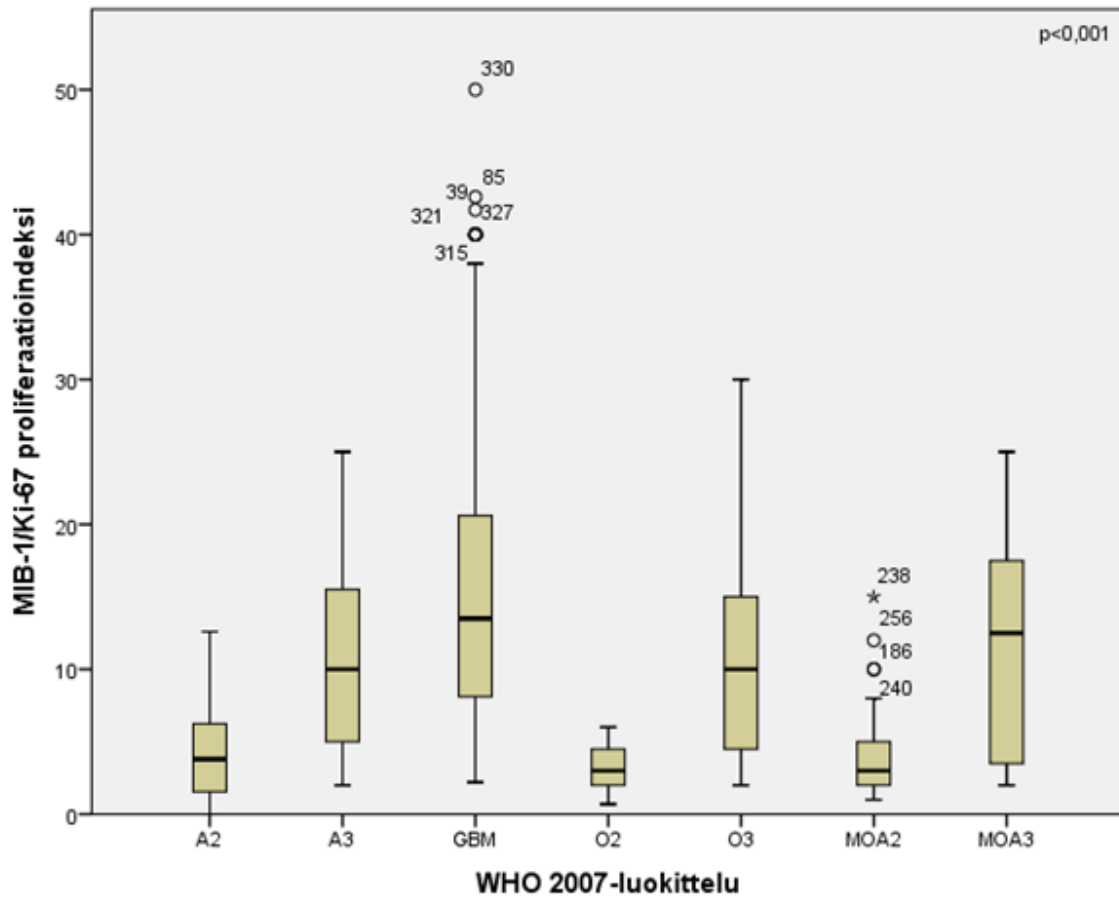
Kuvassa 1 on esitetty MIB-1-proliferaatioindeksit tuumorityypeittäin WHO 2016-luokitelluissa kasvaimissa. Kuvasta nähdään, että proliferaatioindeksi on korkein IDH-villityypin glioblastoomilla (GBM, IDH-wt) (N=157). Toiseksi korkein proliferaatioindeksi on graduksen III IDH-villityypin astrozytroomalla (A3, IDH-wt) (N=13) ja vasta tämän jälkeen tulevat IDH-mutantit glioblastoomat (GBM, IDH-mut) (N=14). Graduksen III IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendrogliomien (O3, IDH-mut ja 1p/19q-kodel) (N=22) proliferaatioindeksi on hieman korkeampi kuin graduksen III IDH-mutantti astrozytroomien (A3, IDH-mut) (N=13). Graduksen II IDH-villityypin astrozytroomien (A2, IDH-wt) (N=11) proliferaatioindeksi on IDH-mutatoituneita (A2, IDH-mut) (N=30) hieman korkeampi ja pienin proliferaatioindeksi on graduksen II IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendrogliomilla (O2, IDH-mut ja 1p/19q-kodeletio) (N=26) ($p<0,001$).

Kuvassa 2 näkyy MIB-1-proliferaatioindeksit, kun kasvaimet on luokiteltu WHO 2007:n kriteerien mukaisesti. Sen mukaan korkein proliferaatioindeksi on graduksen III oligoastrozytroomilla (MOA3) (N=8) ja glioblastoomat (GBM) (N=171) ovat vasta toisena. Graduksen III astrozytroomilla (A3) (N=22) ja graduksen III oligodendrogliomilla (O3) (N=20) on lähes toisiaan vastaavat proliferaatioindeksit. Pienin proliferaatioindeksi on WHO 2007-luokittelussa graduksen II oligodendrogliomilla (O2) (N=23) ($p<0,001$).

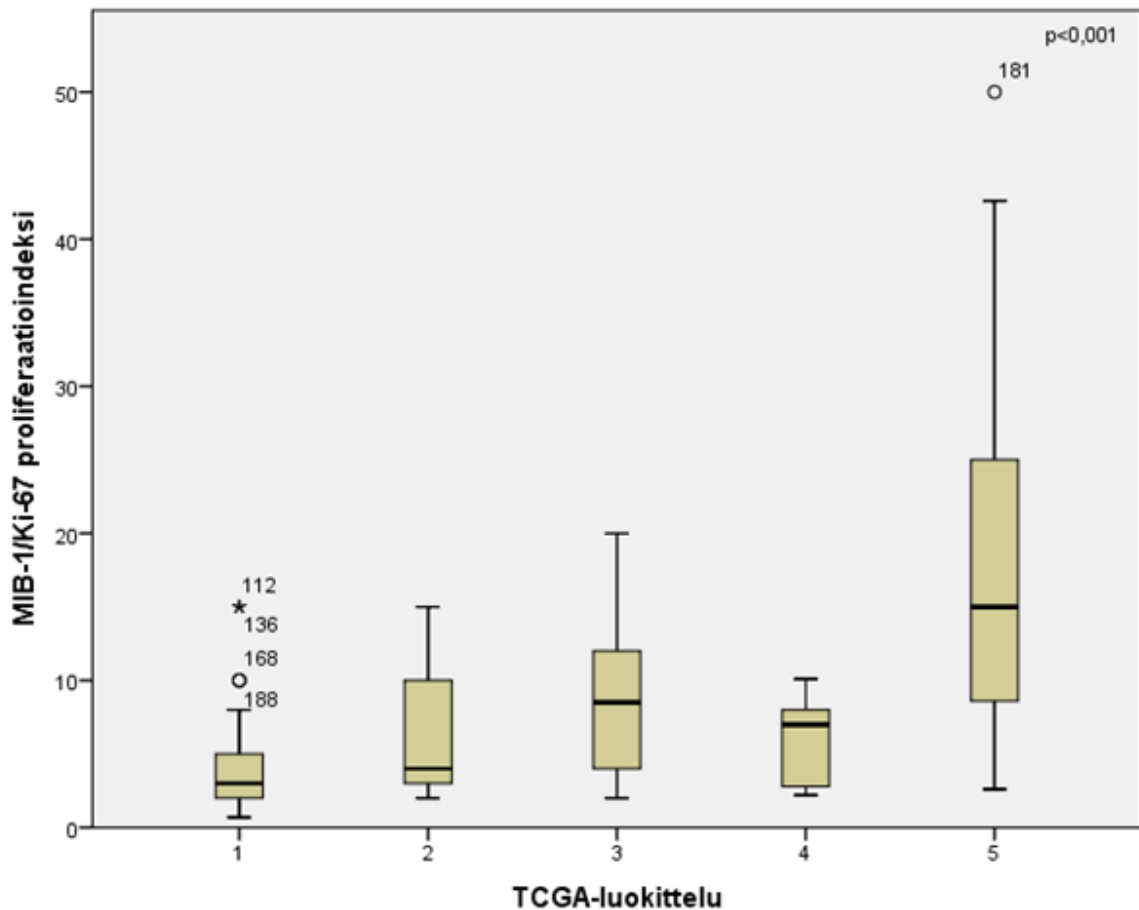
Kuvan 3 TCGA-luokitelluista kasvaimista selkeästi korkein proliferaatioindeksi on IDH-villityypin glioblastoomilla (luokka 5) (N=133). Luokkien 2 ja 3 eli IDH-mutatoituneiden (N=10) ja IDH-villityypin (N=6) graduksen II ja III tuumoreiden, joissa ei ole kodeletiota, proliferaatioindeksit muistuttavat toisiaan. IDH-mutatoituneiden glioblastoomien (luokka 4) (N=5) proliferaatioindeksi on näitä alhaisempi. Pienin proliferaatioindeksi on IDH-mutatoituneilla ja 1p/19q-kodeletoituneilla tuumoreilla (luokka 1) (N=25) ($p<0,001$).



Kuva 1. MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksin vaihtelut tuumorityypeittäin WHO 2016-luokitelluissa kasvaimissa. Graduksen II IDH-mutantteja astrozytoomia on 30, graduksen II IDH-villityyppi astrozytoomia 11, graduksen III IDH-mutantteja astrozytoomia 16, graduksen III IDH-villityyppi astrozytoomia 13, IDH-villityyppi glioblastoomia 157, IDH-mutantti glioblastoomia 14, graduksen II IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendroglioomia 26 ja graduksen III IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendroglioomia 22.



Kuva 2. MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksin vaihtelut tuumorityypeittäin WHO 2007-luokitelluissa kasvaimissa. Graduksen II astrozytoomia on 23, graduksen III astrozytoomia 22, glioblastoomia 171, graduksen II oligodendroglioomia 23, graduksen III oligodendroglioomia 20, graduksen II oligoastrozytoomia 22 ja graduksen III oligoastrozytoomia 8.



Kuva 3. MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksin vaihtelut TCGA-luokitelluissa kasvaimissa. Luokassa 1 on gradusten II ja III IDH-mutatoituneet ja 1p/19q-kodeletoituneet tuumorit (N=25), luokassa 2 gradusten II ja III IDH-mutatoituneet tuumorit, joissa ei ole kodeleetiota (N=10), luokassa 3 gradusten II ja III IDH-villityypin tuumorit, joissa ei myöskään ole kodeleetiota (N=6), luokassa 4 graduksen IV IDH-mutatoituneet glioblastoomat (N=5) ja luokassa 5 graduksen IV IDH-villityypin glioblastoomat (N=133)

3.4 Eloojäämisanalyysit

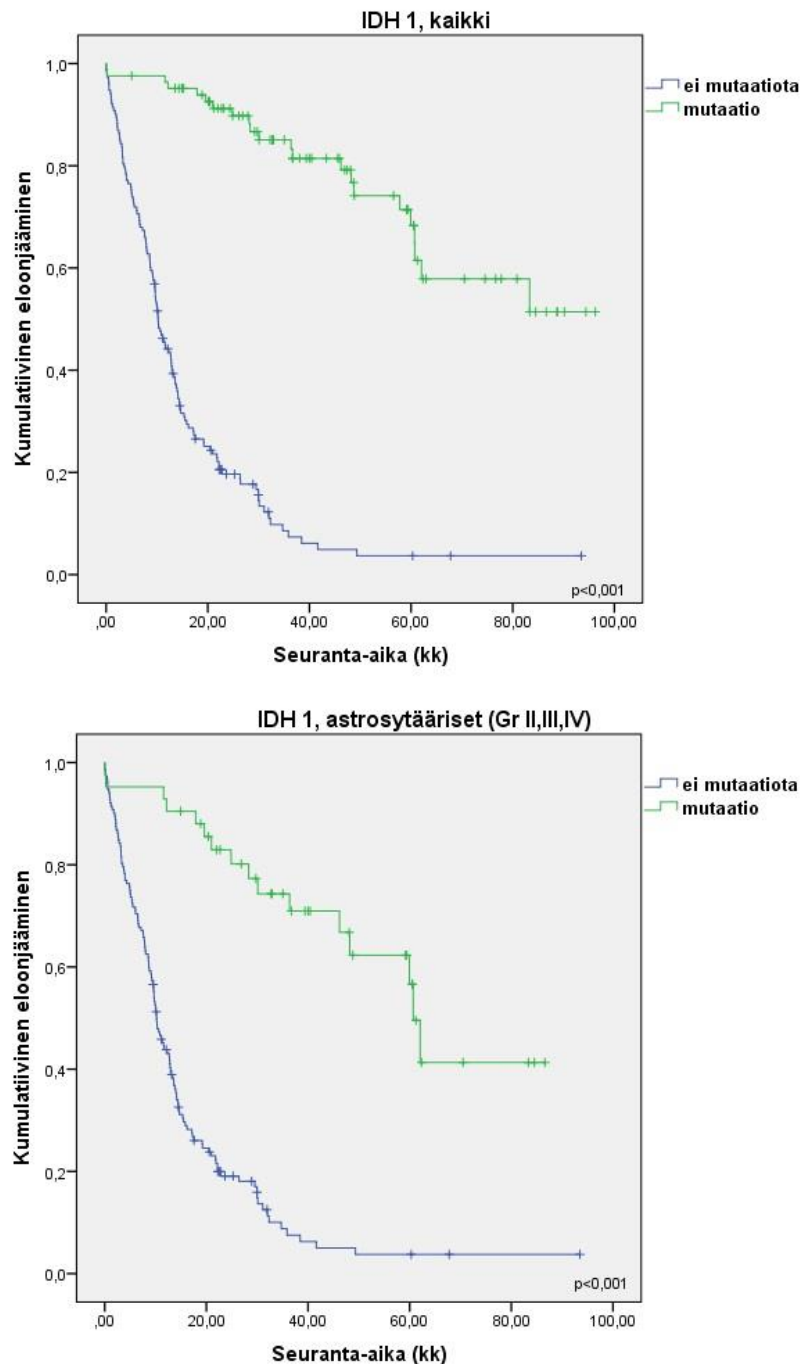
Kuvissa 4, 5, 6 ja 7 on esitetty IDH- ja ATR-mutaatioiden sekä p53:n ekspressoitumisen ja EGFR-monistumien vaikutus eloonjäämiseen. Kaplan Meyer-käyrissä on mukana vain aineiston primaarituumorit.

3.4.1 IDH 1

Kuvassa 4 on esitetty IDH 1-mutaation vaikutus eloonjäämiseen kaikissa aineiston primaarituumoreissa ja erikseen astrozytäärisissä primaarituumoreissa. IDH 1-mutaatio parantaa

ennustetta huomattavasti ja merkitys on vielä suurempi koko aineistoa tarkastellessa.

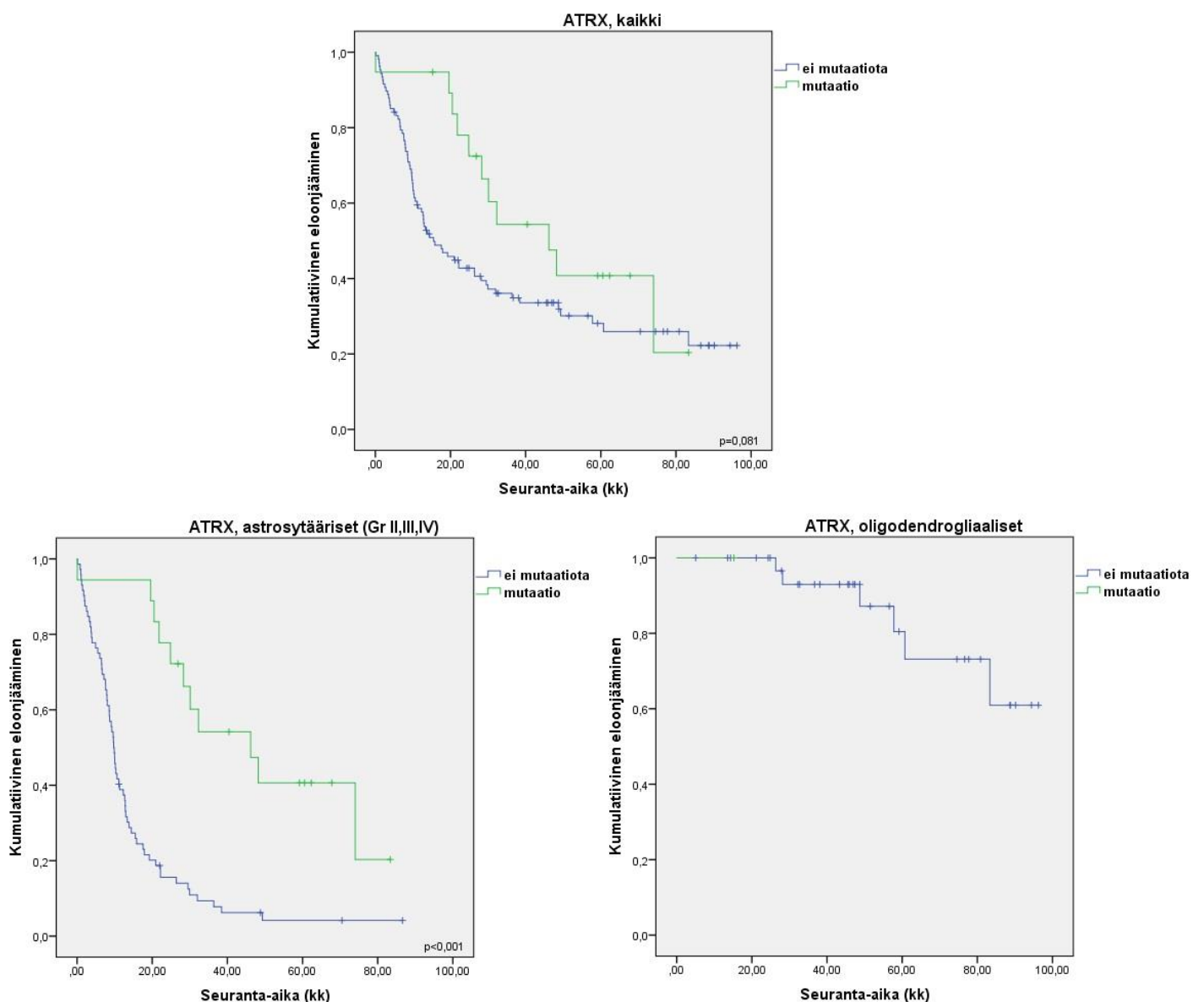
Astrozyttärisissä kasvaimissa kahden vuoden kohdalla noin 80 % niistä potilaista, joilla kasvaimesta löytyi IDH-mutaatio, oli elossa, kun vastaava osuus villityypin kasvainpotilailla oli noin 20 %. Viiden vuoden kohdalla eloonjäämisprosentit olivat IDH-mutatoituneilla noin 40 % ja villityypeillä noin 7,5 % ($p < 0,001$).



Kuva 4. IDH 1-mutaation vaikutus eloonjäämiseen koko aineiston tuumoreissa ja eriteltynä astrozyttärisissä gradusten II, III ja IV tuumoreissa. Koko aineistossa IDH 1-mutatoituneita primaarituumoreita oli 83 ja villityyppejä 153. Astrozyttärisissä primaarituumoreissa IDH 1-mutatoituneita oli 42 ja villityyppejä 152.

3.4.2 ATRX

Kuvassa 5 on esitetty ATRX-mutaation vaikutus eloonjäämiseen. Ylimmässä kuvaajassa, missä on esitettyinä kaikki aineiston primaarituumorit, ei saada tilastollisesti merkittävää eroa eloonjäämisennusteisiin kasvainpotilaiden välille, joilla joko on ATRX-mutaatio tai ei ole ($p=0,081$). Sen sijaan ero saadaan, kun tutkitaan vain astrosytäärisiä tuumoreita (gradukset II,III ja IV) ($p<0,001$). Tällöin ATRX-mutaatio näyttäisi parantavan eloonjäämisennustetta. Viiden vuoden kohdalla potilaista, joiden kasvaimessa on ATRX-mutaatio, on elossa 40 %, kun taas niistä, joilla mutaatiota ei ole, on elossa vain noin 7,5 %. ATRX-mutatoituneita oligodendrogliaalisia kasvaimia on aineistossa vain yksi kappale, joten sen merkitystä ei voida arvioida.

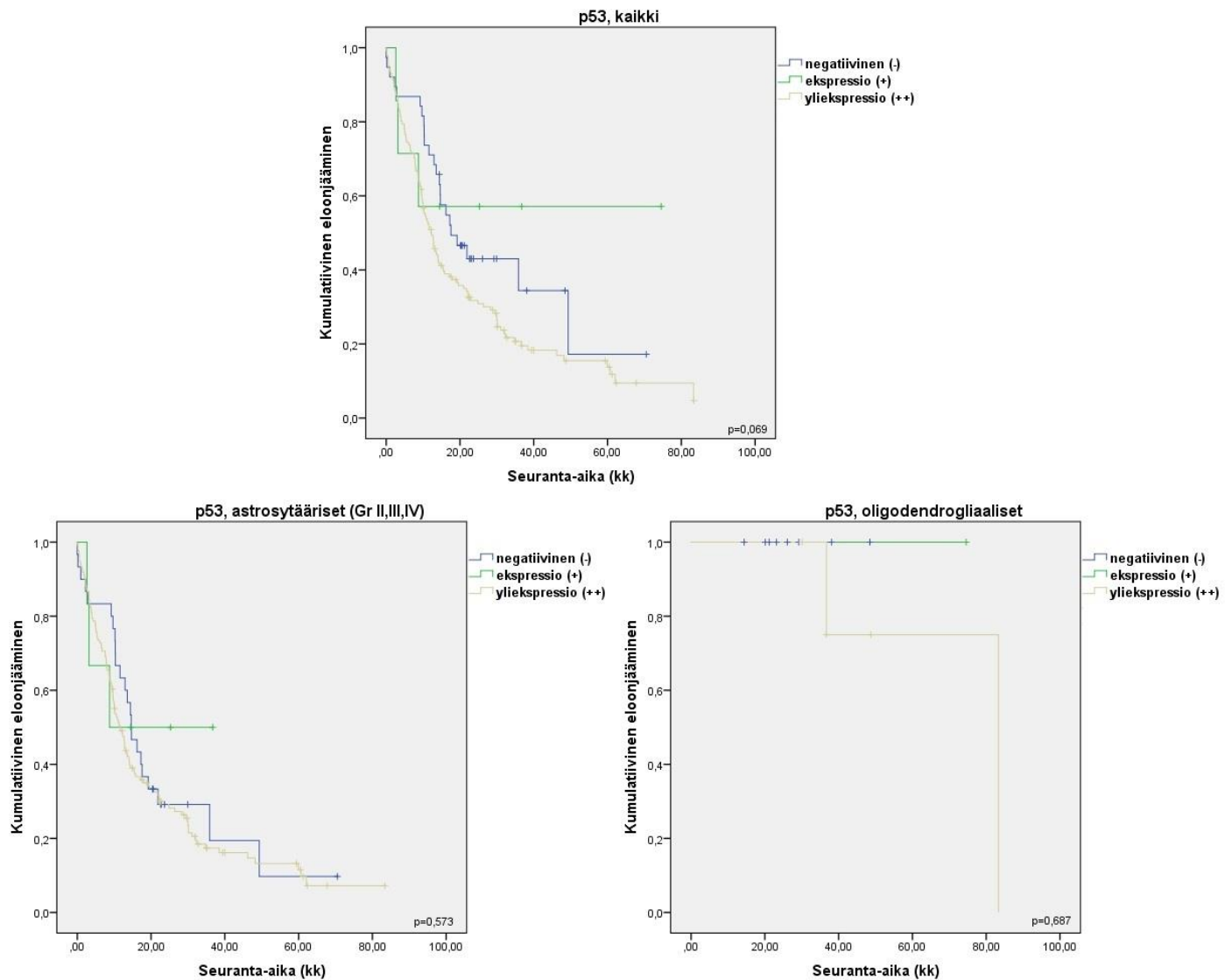


Kuva 5. ATRX-mutaation vaikutus eloonjäämiseen koko aineiston primaarituumoreissa ja eriteltynä astrosytäärisissä (gradukset II,III ja IV) ja oligodendrogliaalisisissa tuumoreissa. Koko aineistossa ATRX-mutatoituneita primaarituumoreita oli 19 ja villityyppejä 107. Astrosytäärisissä

primaarituumoreissa ATRX-mutatoituneita oli 18 ja villityyppejä 72 kun taas oligodendroglialisissa ATRX-mutatoituneita oli 1 ja villityyppejä 35.

3.4.3 p53

Kuvassa 6 on esitetty p53:n ekspressoitumisen vaikutus eloonjäämiseen. Vahvasti positiivinen immunohistokemiallinen p53-värjäys saattaa viitata joko mutaatioon kyseisessä geenissä tai voimakkaaseen yliekspressioon. Ylimmässä kuvaajassa, missä on esitettynä kaikki aineiston primaarituumorit, saadaan lähes tilastollisesti merkittävä ero, ja sen mukaan p53 negatiiviset näyttävät selviävän yliekspressoituneita paremmin ($p=0,069$). Ero on suurimmillaan kolmen vuoden kohdalla, sillä silloin potilaista, joiden kasvaimessa ei ole p53 yliekspressiota, on elossa noin 35 %, kun taas niistä potilaista, joiden kasvaimessa yliekspressio on, on elossa vain noin 20 %. Viiden vuoden kohdalla erot ovat tasoittuneet ja elossa on noin 20 % molemmissa kasvainluokissa. Myöskään eriteltynä alaluokittain graduksen II, III ja IV astrozytomaan ($p=0,573$) ja oligodendrogliomaan ($p=0,687$) ei saada esiin tilastollisesti merkittäviä eroja p53 yliekspressoituneiden ja p53 negatiivisten kasvainpotilaiden eloonjäämisten välille.

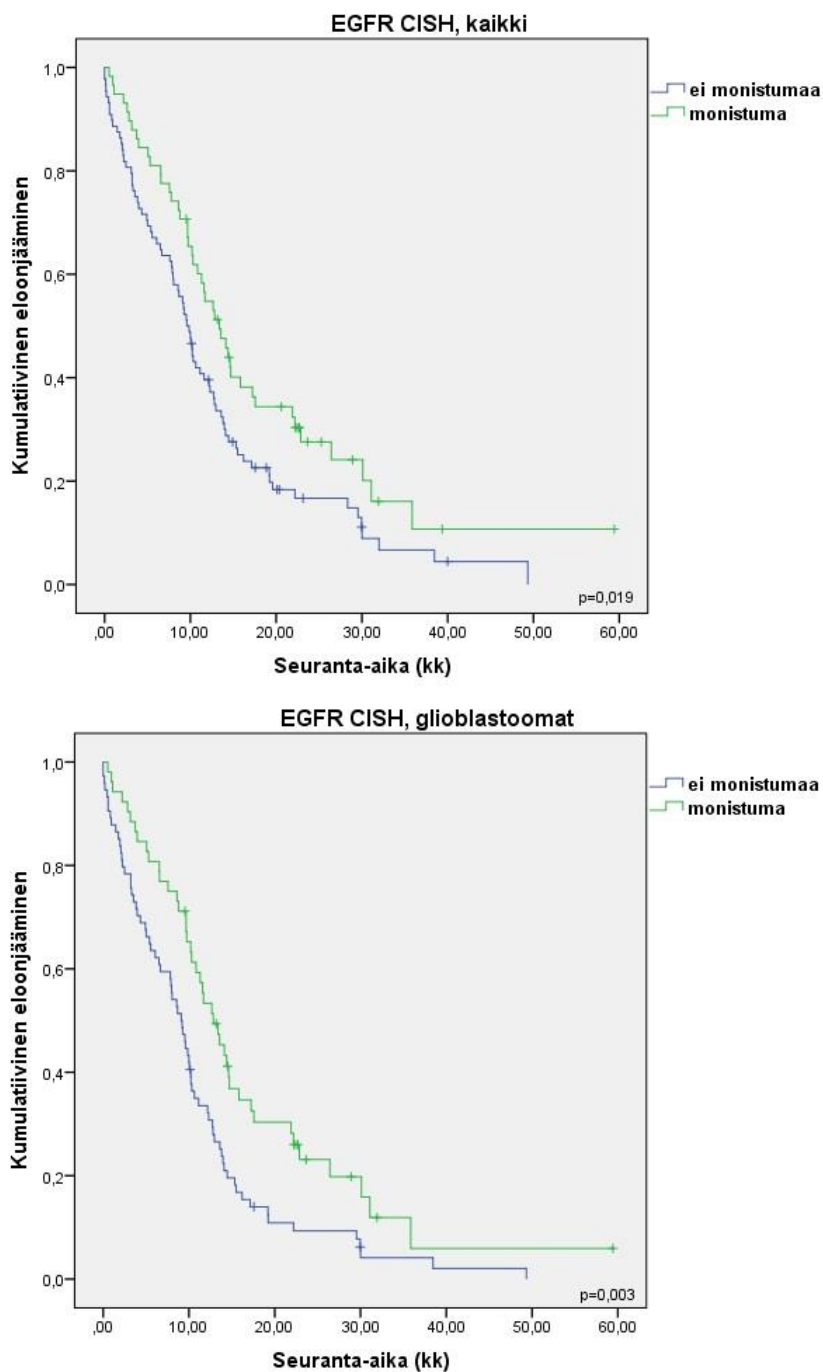


Kuva 6. p53-mutaation vaikutus eloonjäämiseen koko aineiston primaarituumoreissa ja eriteltynä astrozytaarisissa (gradukset II, III ja IV) ja oligodendrogliaalisissa primaarituumoreissa. Koko aineistossa p53 yliksspressoituneita primaarituumoreita oli 141, negatiivisia 38 ja ekspressoituneita 7. Astrozytaarisissa primaarituumoreissa p53 yliksspressoituneita oli 136, negatiivisia 30 ja ekspressoituneita 6 kun taas oligodendrogliaalisissa p53 yliksspressoituneita oli 5, negatiivisia 8 ja ekspressoituneita 1.

3.4.4 EGFR

Kuvassa 7 on esitetty CISH-tekniikan avulla havaittujen EGFR-monistumien vaikutus eloonjäämiseen kaikissa aineiston primaarituumoreissa ja glioblastoomissa. Koko aineistollekin saadaan tilastollisesti merkittävä ero ($p=0,019$), mutta erityisesti glioblastoomapotilailla saadaan esille parempi ennuste niille potilaille, joilla on EGFR-monistuma ($p=0,003$). Ero on suurimmillaan

noin 1,5 vuoden kohdalla, kun niistä potilaista, joilla monistuma on, on elossa 30 % kun taas niistä, joilla monistumaa ei ole, on elossa noin 15 %.

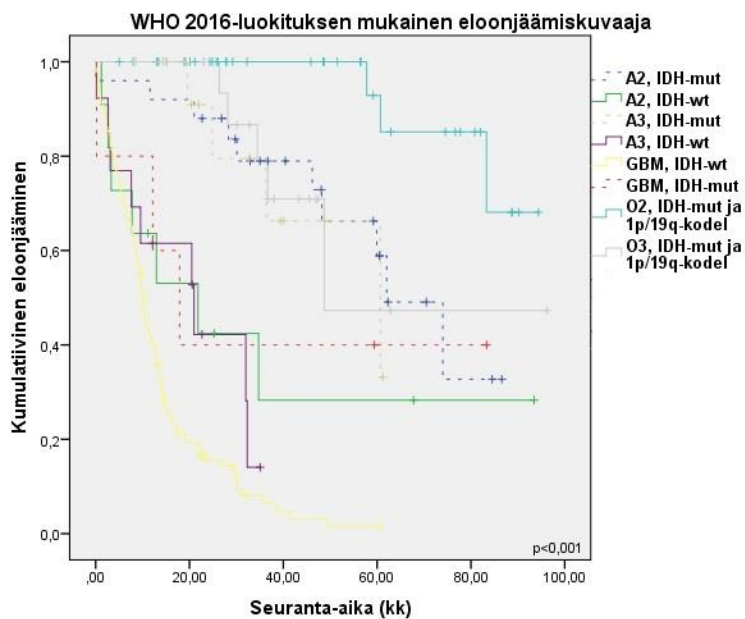
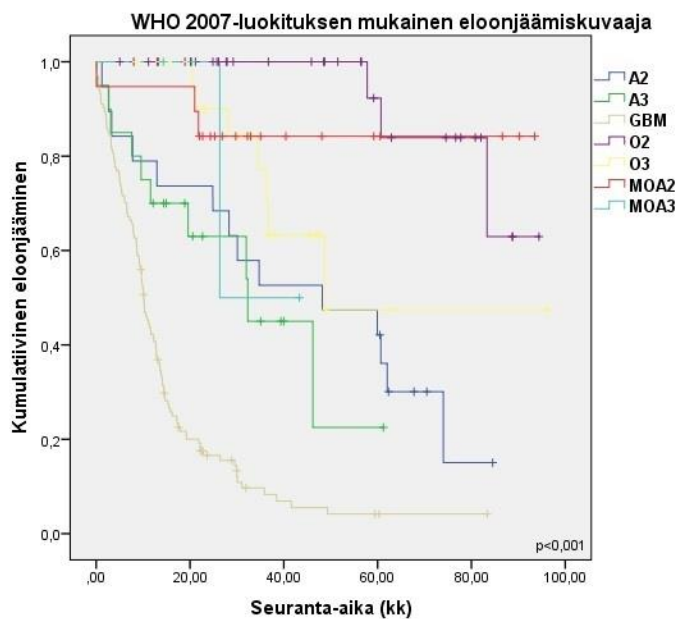


Kuva 7. EGFR CISH-monistuman vaikutus eloonjäämiseen koko aineiston primaarituumoreissa ja eriteltynä glioblastoomissa. Koko aineistossa EGFR-monistuneita primaarituumoreita oli 58 ja villityyppejä 88. Glioblastoomissa EGFR-monistuneita oli 52 ja villityyppejä 74.

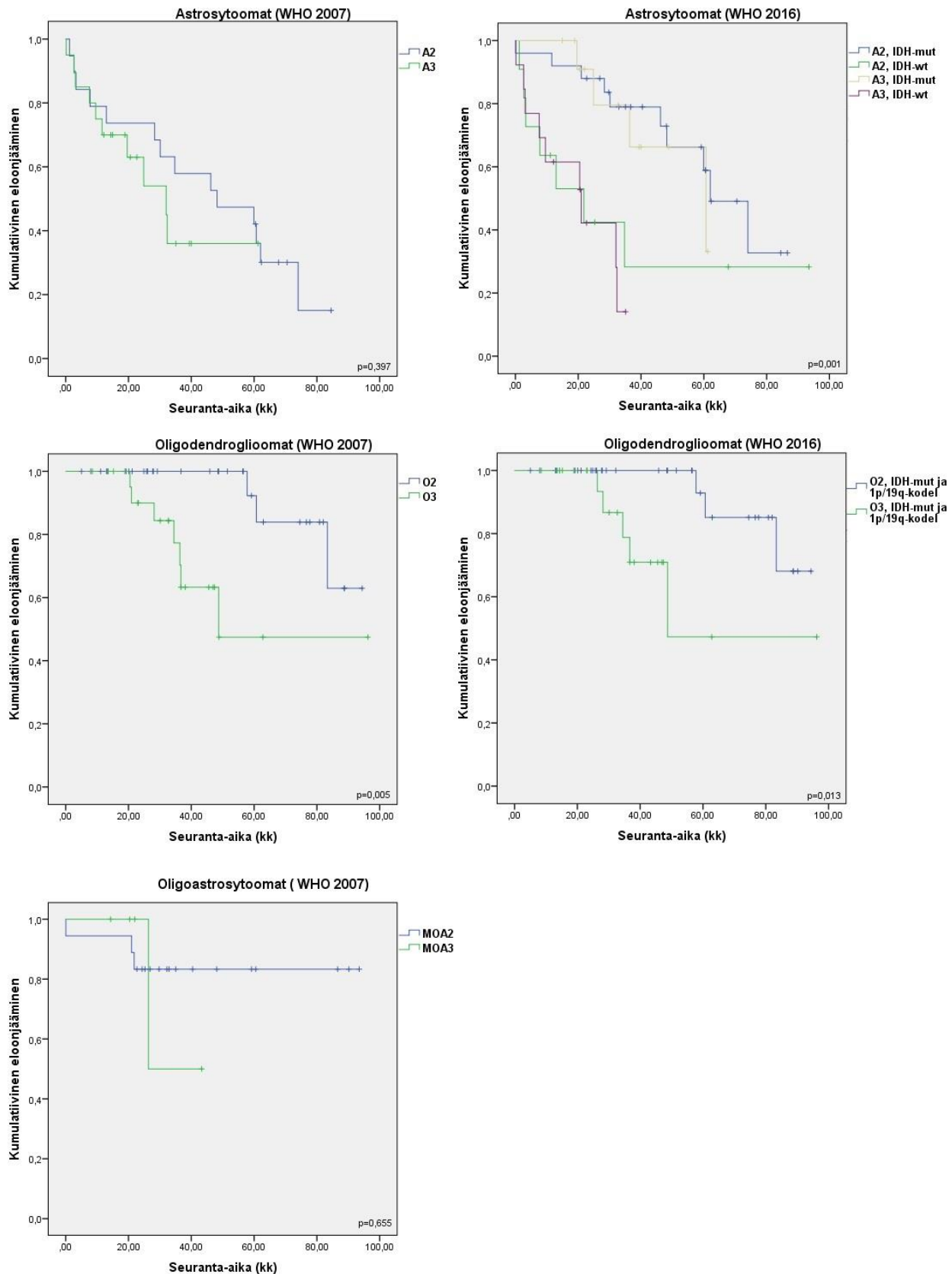
3.4.5 WHO-luokitukset

Kuvissa 8, 9 ja 10 on esitetty WHO-luokitusten mukaiset eloonjäämiskuvaajat aineiston primaarituumoreista. Kuvasta 8 nähdään, että paras ennuste on WHO 2007-luokituksessa graduksen II oligodendroglioomilla (O2) (N=34) ja myös vuoden 2016-luokituksessa graduksen II IDH-mutantit ja 1p/19q-kodeletoituneet oligodendroglioomapotilaat pärjäävät parhaiten (O2, IDH-mut ja 1p/19q-kodel) (N=35). Huonoin ennuste on WHO 2007-luokituksessa glioblastoomilla (GBM) (N=134) ja WHO 2016-luokituksessa IDH-villityypin glioblastoomilla (GBM, IDH-wt) (N=129). Sen sijaan IDH-mutantit glioblastoomat (GBM, IDH-mut) (N=5) pärjäävät hieman paremmin ja niiden eloonjäämiskuvaaja on samantapainen kuin gradusten II (A2, IDH-wt) (N=11) ja III (A3, IDH-wt) (N=13) IDH-villityypin astrozytoomilla ($p<0,001$).

Kun tarkastellaan kuvaa 9, huomataan, että vuoden 2007-luokittelussa gradusten II (A2) (N=19) ja III (AIII) (N=20) astrozytoomien välille ei saada merkitsevää tilastollista eroa ennusteeseen ($p=0,397$). Sen sijaan vuoden 2016-luokittelussa saadaan tilastollinen ero, joka osoittaa, että astrozyttäarisissä gradusten II ja III kasvaimissa se, onko kasvaimessa IDH-mutaatio vai ei, kertoo paremmin eloonjäämisennusteesta kuin gradus. Graduksen III IDH-mutantteja astrozytoomapotilaita (A3, IDH-mut) (N=13) on elossa kahden vuoden kuluttua 80 % ja ne pärjäävät siis lähes yhtä hyvin kuin graduksen II IDH-mutantit astrozytoomat (A2, IDH-mut) (N=25) joita on elossa tällöin noin 90 %. Graduksen II IDH-villityypin astrozytoomapotilaita on elossa vain noin 40 % eli niiden selviytyminen on yhtä heikkoa kuin graduksen III IDH-villityypin astrozytoomapotilailla, joita on myös elossa noin 40 % ($p=0,001$). Oligodendroglioomien kuvaajat ovat lähes samanlaiset, kun verrataan keskenään vuoden 2007- ja 2016-luokitteluita ($p=0,005$ ja $p=0,013$). Vuoden 2007-luokittelun oligoastrozytoomien eloonjäämiskuvaaja ei anna merkitsevää tulosta, ja kertookin siitä, että oligoastrozytoomat ovat melko heterogeeninen ryhmä ($p=0,655$). Kuvasta 10 nähdään, että myös glioblastoomien välille saadaan tilastollisesti merkitsevä ero vuoden 2016-luokituksessa, kun verrataan IDH-mutantteja (GBM, IDH-mut) (N=129) IDH-villityyppeihin (GBM, IDH-wt) (N=5). 2 vuoden kohdalla glioblastoomapotilaista, joilla on IDH-mutaatio, oli elossa 40 %, kun IDH-villityypin kasvainpotilaista elossa oli noin 18 % ($p=0,042$).

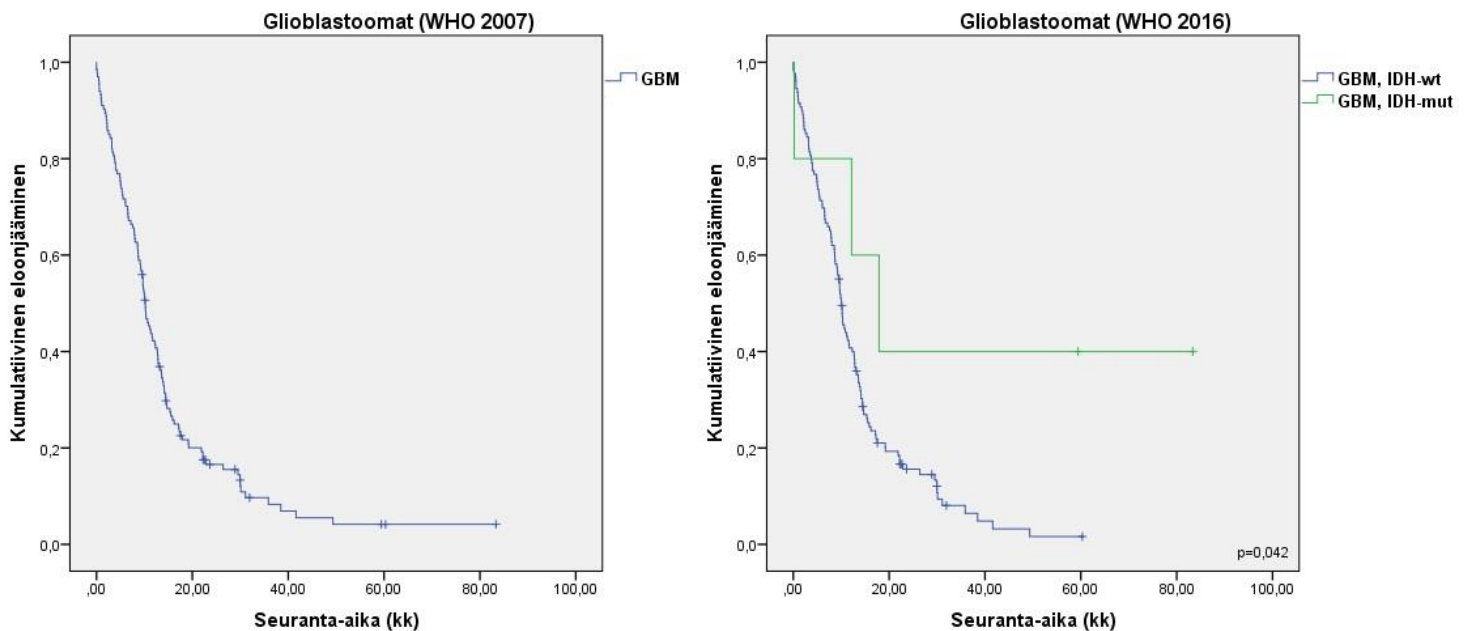


Kuva 8. WHO 2007 ja 2016-luokiteltujen primaarituumorien eloonjäämisennusteet. WHO 2007-luokituksessa graduksen II astrozytoma on 19, graduksen III astrozytoma 20, glioblastoma 134, graduksen II oligodendroglioma 34, graduksen III oligodendroglioma 24, graduksen II oligoastrozytoma 18 ja graduksen III oligoastrozytoma 5 kappaletta. WHO 2016-luokituksessa graduksen II IDH-mutantteja astrozytoma on 25, graduksen II IDH-villityyppi astrozytoma 11, graduksen III IDH-mutantteja astrozytoma 13, graduksen III IDH-villityyppi astrozytoma 13, IDH-villityyppi glioblastoma 129, IDH-mutantti glioblastoma 5, graduksen II IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendroglioma 35 ja graduksen III IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeletio oligodendroglioma 23.



Kuva 9. WHO 2007 ja 2016-luokiteltujen primaarituumorien eloonjäämisennusteet jaoteltuna alaryhmittäin. Vuoden 2007-luokituksissa graduksen II astrozytomia on 19, graduksen III astrozytomia 20, graduksen II oligodendrogliomia 34, graduksen III oligodendrogliomia 24, graduksen II oligoastrozytomia 18 ja graduksen III oligoastrozytomia 5. Vuoden 2016-

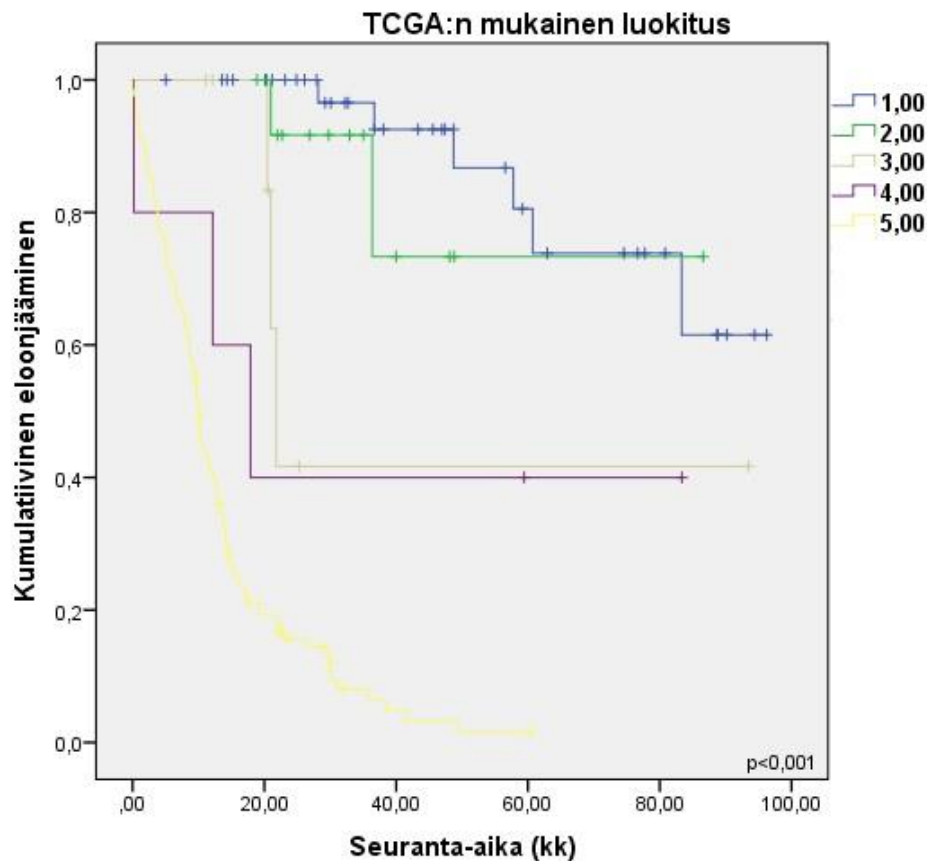
luokituksessa graduksen II IDH-mutantteja astrozytoma on 25, graduksen II IDH-villityyppi astrozytoma 11, graduksen III IDH-mutantteja astrozytoma 13, graduksen III IDH-villityyppi astrozytoma 13, graduksen II IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleetio oligodendroglioma 35 ja graduksen III IDH-mutantti ja 1p/19q-kodeleetio oligodendroglioma 23.



Kuva 10. WHO 2007 ja 2016-luokiteltujen primaaristen glioblastoomien eloonjäämisennusteet. 2007-luokituksessa glioblastoomia on 134 ja 2016-luokituksessa IDH-villityyppi glioblastoomia 129 ja IDH-mutantti glioblastoomia 5 kappaletta.

3.4.6 TCGA-ryhmien luokitus

TCGA-luokitteluperusteiden jaoteltujen primaarituumorien eloonjäämiskuvaajat on esitetty kuvassa 11. Ennusteet ovat samankaltaiset kuin TCGA-tutkimuksessa. IDH 1-mutaatio ja 1p/19q-kodeleetio antavat parhaan eloonjäämisennusteen. TCGA-ryhmän tutkimuksessa osoitettiin, että graduksen III IDH-villityypin glioomapotilailla on huonompi eloonjäämisennuste kuin glioblastoomapotilailla, joilla on IDH 1-mutaatio kasvaimessaan. Tässä tutkimuksessa gradusten II ja III tuumorit oli yhdistetty, joten tämän kuvaajan perusteella ei voida sanoa, ovatko tulokset vastaavat, mutta luokan 3 eloonjäämiskuvaaja, jossa on IDH-villityypin gradusten II ja III tuumorit, muistuttaa paljon luokan 4 eloonjäämiskuvaajaa, jossa on siis IDH-mutatoituneet glioblastoomat. Sen sijaan IDH-mutatoituneet graduksen II ja III tuumoripotilaat pärjäävät huomattavasti paremmin, vaikka kodeleetiota ei olisikaan ($p < 0,001$). Näin ollen voidaan todeta IDH-mutaatiolla olevan merkittävä vaikutus eloonjäämisennusteeseen.



Kuva 11. Aineiston primaarituumorit eloonjäämisennusteet luokiteltuna TCGA:n kriteerien mukaisesti. Gradusten II ja III tuumorit on jaoteltu siten, että luokassa 1 on IDH-mutatoituneet ja 1p/19q-kodeletoituneet tuumorit (N=39), luokassa 2 IDH-mutatoituneet tuumorit, joissa ei ole kodeleetiota (N=14) ja luokassa 3 IDH-villityypin tuumorit, joissa ei myöskään ole kodeleetiota (N=8). Graduksen IV tuumorit on jaoteltu luokkiin 4 ja 5 siten, että luokassa 4 on IDH-mutatoituneet glioblastoomat (N=5) ja luokassa 5 IDH-villityypin glioblastoomat (N=129).

1.6 Cox-monimuttujamalli

Coxin monimuuttujamalli osoittaa, että vertailtaessa WHO 2007- ja 2016-luokituksia, 2007-luokitus toimii itsenäisenä ennustetekijänä paremmin (taulukko 11). Kun vertailuun otettiin mukaan IDH 1- ja 1p/19q-kodeleetiostatukset saatiin tulokseksi, että IDH 1-status toimi itsenäisenä ennustetekijänä vielä WHO 2007-luokitusta paremmin (taulukko 12). Parhaimpana ennustetekijänä toimi TCGA-luokittelu, joka osoittautui paremmaksi ennustetekijäksi kuin WHO 2007- ja WHO 2016-luokittelut (taulukko 13).

| Taulukko 11 | Cox-monimuuttujamalli: Molekyylipatologinen luokittelu - WHO 2007 ja WHO 2016 | | | |
|--------------------|--|-------------------|--|----------------|
| | p-arvo | riskisuhde | 95 %:n luottamusväli riskisuhteelle | |
| | | | alaraja | yläraja |
| WHO | | | | |
| 2007 | 0.000 | 0.999 | 0.999 | 1.000 |
| WHO | | | | |
| 2016 | 0.001 | 0.999 | 0.998 | 1.000 |

Taulukko 11. Coxin monimuuttujamallin itsenäiset ennustetekijät vertailtaessa vanhaa ja uutta WHO:n luokitusta keskenään. Malli osoittaa, että WHO 2007-luokitus toimii hieman paremmin itsenäisenä ennustetekijänä kuin WHO 2016-luokitus.

| Taulukko 12 | Cox-monimuuttujamalli: Molekyylipatologinen luokittelu - WHO 2007, WHO 2016, IDH 1 ja 1p/19q-kodeleetio | | | |
|--------------------|--|-------------------|--|----------------|
| | p-arvo | riskisuhde | 95 %:n luottamusväli riskisuhteelle | |
| | | | alaraja | yläraja |
| WHO | | | | |
| 2007 | 0.046 | 0.999 | 0.998 | 1.000 |
| IDH 1 | 0.000 | 0.031 | 0.004 | 0.213 |

Taulukko 12. Coxin monimuuttujamallin itsenäiset ennustetekijät vertailtaessa WHO 2016-luokitusta, WHO 2007-luokitusta, IDH 1-statusta ja 1p/19q-kodeleetio-statusta. Vertailussa WHO 2016-luokitus ja 1p/19q-kodeleetio-status eivät tulleet itsenäisiksi ennustetekijöiksi. Malli osoittaa, että IDH 1-status toimii paremmin itsenäisenä ennustetekijänä kuin WHO 2007-luokitus.

| Taulukko 13 | Cox-monimuuttujamalli: Molekyylipatologinen luokittelu - WHO 2007, WHO 2016 ja TCGA | | | |
|--------------------|--|-------------------|--|----------------|
| | p-arvo | riskisuhde | 95 %:n luottamusväli riskisuhteelle | |
| | | | alaraja | yläraja |
| TCGA | 0.000 | 2.307 | 1.883 | 1.000 |

Taulukko 13. Coxin monimuuttujamallin mukaan TCGA oli paras itsenäinen ennustetekijä vertailtaessa sitä ja WHO 2007- ja WHO 2016-luokituksia. WHO:n luokitukset eivät tulleet itsenäisiksi ennustetekijöiksi.

POHDINTA

Tutkimuksen tavoitteena oli luokitella Taysissa leikatut diffuusit glioomat uudelleen vuoden 2016 WHO:n kriteerien mukaisesti ja selvittää, antaako uusi vai vanha (2007) luokitus paremman prognostisen arvon. Lisäksi tavoitteena oli pohtia, miten diffuusit glioomat kannattaisi luokitella, eli olisiko ehkä mahdollista tulevaisuudessa luokitella niitä pelkästään molekyylidatan perusteella ja ovatko gradukset sen jälkeen merkityksellisiä diagnostiikassa. Tämän vuoksi kasvaimet luokiteltiin myös TCGA-kriteerien mukaisesti luokkakajoihin. Lisäksi haluttiin arvioida yksittäisten molekyyligeneettisten parametrien vaikutuksia elinajanodotteisiin ja sitä, miten MIB-1-proliferaatioindeksi vaihtelee kasvaintyyppien välillä ja mikä on sen diagnostinen arvo.

4.1 IDH 1

IDH 1-mutaatio löytyi tässä aineistossa gradusten II ja III astrozytoomapotilaista 69 %:lta. Glioblastoomissa se esiintyi vain 6 %:lla. Kuten on jo aikaisemmin osoitettu, myös tässä tutkimuksessa IDH-mutaatio antoi huomattavasti paremman prognoosin kasvainpotilaille (16). Ero oli niinkin merkittävä, että astrozytäärisissä gradusten II, III ja IV tuumoreissa elossaolo-osuus oli kahden vuoden kohdalla 80 %, mikäli kasvaimesta oli löydetty IDH-mutaatio, kun IDH-villityyppien kohdalla osuus oli vain 20 %. IDH-mutaatio on siis erittäin merkittävä tekijä kasvainpotilaiden ennusteessa.

4.2 ATRX

ATRX-mutaatio esiintyi 61 %:lla gradusten II ja III astrozytoomapotilaista ja 4 %:lla glioblastoomapotilaista. Oligodendroglioomapotilailla ATRX-mutaatio havaittiin 5 %:lla. ATRX-mutaatio osoittautui elinajanennustetta parantavaksi tekijäksi astrozytäärisissä tuumoreissa. Ero oli selkeä esimerkiksi viiden vuoden kohdalla, jolloin kaikista ATRX-mutaation omaavista tuumoripotilaista oli elossa 40 %, kun niistä, joilla mutaatiota ei ollut, oli elossa noin 7,5 %. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että se esiintyy lähes aina yhdessä IDH-mutaation kanssa.

4.3 p53

Astrozytäärisistä gradusten II ja III tuumoripotilaista 83 %:lla p53 oli yliekspressoitunut. Glioblastoomapotilaista vastaavasti yliekspressoituneita tapauksia oli 79 % ja

oligodendroglioomapotilaista 30 %. p53:n poikkeavalle ekspressiolle ei tässä tutkimuksessa saatu tilastollista merkitystä ennusteen arvioinnissa. Tämä on sama tulos, mikä yleisestikin on saatu, kun on tutkittu p53:n vaikutusta gliomien prognoosiin (22).

4.4 EGFR

EGFR-monistuma löydettiin tämän aineiston glioblastoomapotilaista 39 %:lta. EGFR-monistuma paransi tämän tutkimuksen mukaan glioblastoomapotilaiden ennustetta. Yleisesti EGFR on liitetty huonompaan ennusteeseen, mutta siitä ei ole yhtenäistä konsensusta (26).

4.5 MIB-1/Ki-67-proliferaatioindeksi

Kuten aiemmin on mainittu, useissa tutkimuksissa on osoitettu, että korkeampi MIB-1-indeksi korreloi yleensä kasvaimen pahanlaatuisuuden kanssa ja näin ollen tyypillisenä glioblastooman merkkinä pidetään korkeaa proliferaatioindeksiä. Proliferaatioindeksin on osoitettu kertovan myös kasvaimen prognoosista. (34)

WHO 2016-luokitteluissa kasvaimissa MIB1-indeksi oli oletetusti korkein IDH-villityypin glioblastoomissa. Graduksen III villityypin astrozytoomien proliferaatioindeksi oli kuitenkin korkeampi, kuin IDH-mutanttien glioblastoomien. Pienin proliferaatioindeksi oli graduksen II oligodendroglioomilla ja nämä potilaat selvisivät myös parhaiten WHO 2016-luokituksen eloonjäämisennusteessa.

WHO 2007-luokittelussa yllättäen korkein proliferaatioindeksi näytti olevan graduksen III oligoastrozytoomilla, vaikka niiden eloonjääminen oli WHO 2007-luokittelussa parempaa kuin graduksen III astrozytoomien ja glioblastoomien. Toisaalta graduksen III oligoastrozytoomia oli tässä vain kahdeksan tapausta, mikä saattaa vaikuttaa tuloksen luotettavuuteen. Graduksen II oligodendroglioomat saivat tässäkin luokittelussa pienimmän proliferaatioindeksin ja WHO 2007-luokittelun eloonjäämiskuvaajassa parhaimman ennusteen.

TCGA-luokittelu antoi korkeimman proliferaatioindeksin IDH-villityypin glioblastoomille, mutta sekä IDH-mutanttien (luokka 2) että IDH-villityypin (luokka 3) gradusten II ja III proliferaatioindeksit olivat korkeampia kuin IDH-mutanttien glioblastoomien. Tähän saattaa vaikuttaa se, että IDH-mutanteja glioblastoomia oli tutkimuksessa mukana vain viisi kappaletta. Eloonjäämisessä luokka 2 selvisi kuitenkin paremmin kuin IDH-mutantit glioblastoomat (luokka 4).

Näin ollen voidaan tämänkin perusteella todeta, että IDH-mutaatiolla on suuri vaikutus kasvaimen ominaisuuksiin, sillä se vaikuttaa merkittävästi myös kasvaimen proliferaatioon.

4.6 Menetelmien ennustearvo

Parhaan elinajanennusteen saivat WHO:n vuosien 2007 ja 2016 luokitteluissa graduksen II oligodendroglioomat ja TCGA-luokittelussa ryhmä 1, johon siis kuuluivat sekä gradusten II että III oligodendroglioomat.

Kaikissa luokitteluissa huonoin elinajanennuste oli glioblastoomilla. TCGA- ja WHO 2016-luokitteluissa nimenomaan erityisen huono IDH-villityypin glioblastoomilla, joiden ennuste erosi melko paljonkin IDH-mutanttien ennusteesta: viiden vuoden kuluttua IDH-villityypin glioblastoomapotilaista olivat kuolleet melkein kaikki, kun IDH-mutanteista elossa oli 40 %. Toisaalta IDH-mutantteja oli vain viisi kappaletta, mikä saattaa vaikuttaa tuloksen luotettavuuteen.

TCGA-luokittelun elinajanennusteissa huomionarvoista on, että IDH-mutanttien glioblastoomien eloonjäämiskäyrä muistuttaa gradusten II ja III kasvaimia, joissa ei ole IDH-mutaatiota eikä 1p/19q-kodeleetiota. Gradus ei siis olisikaan niin merkityksellinen eloonjäämisen kannalta, kun huomioidaan kasvainten IDH-mutaatiostatus.

WHO 2016-luokittelun eloonjäämiskuvaajissa gradusten II ja III IDH-mutanttien astrozytoomien eloonjäämiskuvaajat muistuttavat toisiaan samoin kuin gradusten II ja III IDH-villityypin astrozytoomien kuvaajat toisiaan. Erot ovat melko suuria, sillä esimerkiksi neljän vuoden kohdalla IDH-mutanteista graduksen II astrozytoomapotilaista on elossa 80 %, mutta IDH-villityypin graduksen II astrozytoomapotilaista vain 30 %. Nämä tulokset puhuvat sen puolesta, että astrozytoomat olisi parempi jaotella ennemminkin IDH-statuksen kuin graduksen perusteella.

Oligoastrozytoomat ovat erittäin heterogeeninen ryhmä, jonka vuoksi niiden eloonjäämiskuvaajaan ei saada merkittävää eroa gradusten välille. Siksi onkin hyvä, että suurin osa niistä saadaan uudessa WHO 2016-luokittelussa jaoteltua molekyylidatan perusteella joko astrozytoomiin tai oligodendroglioomiin.

Coxin monimuuttujamalli antaa tuloksen, jonka mukaan TCGA-luokittelu olisi paras itsenäinen ennusteeseen vaikuttava tekijä. Vertailtaessa keskenään pelkästään WHO 2016- ja WHO 2007-

luokitteluja, WHO 2007 on parempi ennusteeseen vaikuttava ryhmittely. Myös pelkällä IDH 1-
statuksella saadaan parempi tulos kuin WHO 2016-luokittelulla monimuuttujamallin mukaan.
Koska TCGA-luokittelussa kasvaimet on luokiteltu molekyylidatan perusteella, eikä graduksia II ja
III ole eroteltu, voitaisiin siis päätellä, että tämä olisi paras tapa luokitella diffuuseja glioomia. On
jopa hieman yllättävää, että vaikka 2016-luokitteluun on lisätty molekyylidata, se ei pärjää
monimuuttujamallissa.

4.7 Lopuksi

TCGA-luokitus osoittautui parhaaksi itsenäiseksi ennustetekijäksi ja se perustuu kasvainten IDH- ja
1p/19q-statusiin sekä nekroosin tai atyyppisen mikrovaskulaarisen proliferaation löytämiseen
tuumorista. Tulosten perusteella vaikuttaa siis siltä, että molekyylogeneettiset parametrit ovat
tärkeässä roolissa diffuusien gliomien ennustearvioinnissa, eli jatkossakin on tärkeää määrittää
kasvainten IDH-, 1p/19q-, ATRX- ja EGFR-statuset. p53:n rooli on kyseenalainen, sillä se ei
vaikuta ennusteeseen, mutta se auttaa kyllä varmistamaan astrozytooman diagnoosia.

Tällä hetkellä sekä astrozytoomien että oligodendrogliomien gradukset erotetaan toisistaan
tiettyjen ominaispiirteiden avulla (35). Kasvaimen gradus vaikuttaa esimerkiksi hoitolinjan
valintaan yhdessä kasvaimen biomarkkereiden ja muun histologian kanssa. Koska tulosten mukaan
gradus ei olisi niin merkittävä tekijä eloonjäämiskuvajissa, herää kysymys, voisiko diagnoosia
asettaa ja ennustetta arvioida jollakin muulla tavalla. Tulevaisuudessa diffuusien gliomien
luokittelu voisi perustua siihen, että aluksi patologi luokittelee kasvaimen diffuusiksi gliomaksi ja
selvittää onko siinä nähtävissä nekroosia tai atyyppista mikrovaskulaarista proliferaatiota. Tämän
jälkeen kasvaimet voitaisiin luokitella TCGA-luokituksen mukaisiin alaryhmiin.

LÄHTEET

1. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol* 2017;18:e315-29.
2. Scheithauer BW. Development of the WHO classification of tumors of the central nervous system: a historical perspective. *Brain Pathol* 2009;19:551-64.
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803-20.

4. Von Deimling A, Huse JT, Yan H, et al. Diffuse astrocytoma. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 18-23. a.
5. Von Deimling A, Huse JT, Yan H, et al. Anaplastic astrocytoma. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 14-27. b.
6. Louis DN, Suvá ML, Burger PC, et al. Glioblastoma, IDH-wildtype. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 18-45. .
7. Ohgaki H, Kleihues P, Von Deimling A, et al. Glioblastoma, IDH-mutant. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 52-56.
8. Reifenberger G, Collins VP, Hartmann C, et al. Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 60-69. a.
9. Reifenberger G, Collins VP, Hartmann C, et al. Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 70-74. b.
10. Reifenberger G, Collins VP, Hartmann C, et al. Oligoastrocytoma. Kirjassa Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, Demling A. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon. 2016. S. 60-69. c.
11. Losman JA, Kaelin WG, Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev* 2013;27:836-52.
12. Liu X, Ling ZQ. Role of isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH 1/2) gene mutations in human tumors. *Histol Histopathol* 2015;30:1155-60.
13. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009;118:469-74.
14. Zhang C, Moore LM, Li X, et al. IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro Oncol* 2013;15:1114-26.
15. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2010;465:966.
16. Shih AH, Levine RL. IDH1 mutations disrupt blood, brain, and barriers. *Cancer Cell* 2012;22:285-7.
17. Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med* 2015;3:95,5839.2015.03.57.

18. Ichimura K, Narita Y, Hawkins CE. Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 2015;129:789-808.
19. Park SH, Won J, Kim SI, et al. Molecular Testing of Brain Tumor. *J Pathol Transl Med* 2017;51:205-23.
20. Haberler C, Wohrer A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clin Neuropathol* 2014;33:108-11.
21. Brandner S, von Deimling A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015;41:694-720.
22. Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, et al. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol* 1999;1:124-37.
23. Haapasalo H, Isola J, Sallinen P, et al. Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am J Pathol* 1993;142:1347-51.
24. van den Bent MJ, Weller M, Wen PY, et al. A clinical perspective on the 2016 WHO brain tumor classification and routine molecular diagnostics. *Neuro Oncol* 2017;19:614-24.
25. Fuller GN, Bigner SH. Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat Res* 1992;276:299-306.
26. Keller S, Schmidt MHH. EGFR and EGFRvIII Promote Angiogenesis and Cell Invasion in Glioblastoma: Combination Therapies for an Effective Treatment. *Int J Mol Sci* 2017;18:10.3390/ijms18061295.
27. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20.
28. Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res* 2006;12:143-7.
29. Key G, Becker MH, Baron B, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993;68:629-36.
30. Olar A, Sulman EP. Molecular Markers in Low-Grade Glioma-Toward Tumor Reclassification. *Semin Radiat Oncol* 2015;25:155-63.
31. Delgado-Lopez PD, Corrales-Garcia EM, Martino J, et al. Diffuse low-grade glioma: a review on the new molecular classification, natural history and current management strategies. *Clin Transl Oncol* 2017.
32. Khan MN, Sharma AM, Pitz M, et al. High-grade glioma management and response assessment-recent advances and current challenges. *Curr Oncol* 2016;23:e383-91.
33. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015;372:2481-98.
34. Sallinen P, Haapasalo H, Visakorpi T, Helen P, Rantala I, Isola J, Helin H. Prognostication astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1) and S-phase using archival paraffin-embedded samples. *J Pathol* 1994;174:275-282.

35. Brat DJ, Perry A. Astrocytic and Oligodendroglial Tumors. Kirjassa Perry A, Brat DJ. Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia. 2010. S.63–102.